



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Master

Estudio de la toxicidad ambiental e *in vitro* de los materiales grafénicos

Autor

Juan José Callejero Marín

Director

Dr. José Luis Pinilla Ibarz

Codirectora

Dra. Eva M^a Galvez Buerba

Ponente

Dr. Julián Pardo Jimeno

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2020

RESUMEN

Los materiales grafénicos son conocidos desde el descubrimiento en 1985 de los fullerenos, y posteriormente, en 2004 del grafeno. El descubrimiento de este último supuso toda una revolución en muchas de las áreas de investigación debida a las excelentes propiedades que presentaban estos materiales (elevada conductividad térmica y eléctrica, alto módulo de Young, etc.). Dentro de los materiales grafénicos, destacan los puntos cuánticos de grafeno “GQDs” (por sus siglas en inglés: graphene quantum dots), que se caracterizan por tener un tamaño nanométrico de entre 3-20 nm y por poseer, además de las características propias de los materiales grafénicos, fotoluminiscencia. La capacidad de ser fotoluminiscentes ha permitido que sean empleados en multitud de aplicaciones, entre las que destaca su uso en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, su utilización a nivel biomédico se ha visto limitada debido a que apenas existen estudios que analicen con profundidad la toxicidad que presentan estos nanomateriales.

En el trabajo presentado se abordó el estudio de la toxicidad ambiental *in vivo* e *in vitro* de los GQDs, y más concretamente, de los puntos cuánticos de óxido de grafeno “GOQDs” (por sus siglas en inglés: graphene oxide quantum dots). Estos nanomateriales se diferencian de los GQDs debido a que presentan grupos oxigenados en su superficie (provenientes del método de exfoliación utilizado en su síntesis), que modifican su fotoluminiscencia. Los GOQDs se sintetizaron a partir de nanofibras de carbono (CNF) de tipo fishbone, mediante un proceso de oxidación/exfoliación. Para poder comprobar la correcta realización de la síntesis, el material se caracterizó mediante distintas técnicas de análisis (SEM, Análisis elemental, XPS y TEM). Una vez caracterizado, se analizó la toxicidad que producían los GOQDs en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), nematodos empleados como modelo de ensayo *in vivo*, siendo sometidos a una exposición aguda (5 días) y crónica (25 días). Por otro lado, se estudió el efecto tóxico de los GOQDs en varias líneas celulares de órganos del sistema digestivo (hepática (Hep G2) e intestinal (Caco-2)) y neuronal (neuroblastoma (SH-SY5Y)), durante un periodo de exposición de 3 y 5 días. A nivel neuronal, también se analizó la toxicidad producida por la presencia de los GOQDs en las células neuronales diferenciadas después de una exposición de 5 días. Por último, se estudió la toxicidad inmunológica producida por los GOQDs en macrófagos, después de una exposición de 5 días.

Gracias a los resultados obtenidos se pudo comprobar que la toxicidad, tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*, que presentan estos nanomateriales depende de la concentración empleada y del periodo de exposición.

ÍNDICE GENERAL

1	<i>Introducción y objetivos</i>	1
1.1	Introducción a los materiales grafénicos.....	1
1.2	Materiales grafénicos.	2
1.3	Puntos cuánticos de grafeno.....	4
1.3.1	Aplicación en el ámbito biomédico	5
1.3.2	Toxicidad	7
1.4	Objetivo	8
2	<i>Parte Experimental</i>	9
2.1	Síntesis de los GOQDs.....	9
2.2	Técnicas de caracterización.....	10
2.2.1	Microscopía electrónica de transmisión	10
2.2.2	Difracción de rayos X.....	10
2.2.3	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X	11
2.2.4	Análisis Elemental.....	11
2.3	Materiales y métodos.....	11
2.3.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	11
2.3.2	Cultivos celulares.....	12
2.3.3	Macrófagos.....	13
2.3.4	Estudio de la toxicidad ambiental <i>in vivo</i>	13
2.3.5	Estudio de la toxicidad <i>in vitro</i>	14
2.3.6	Estudio de la toxicidad inmunológica.....	16
3	<i>Resultados</i>	17
3.1	Caracterización de los GOQDs.....	17
3.2	Estudio de la toxicidad ambiental <i>in vivo</i>	21
3.3	Estudio de la toxicidad <i>in vitro</i>	23
3.4	Estudio de la toxicidad inmunológica.....	28
4	<i>Conclusiones</i>	30
5	<i>Bibliografía</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Formas y dimensiones características de los alótopos del carbono basados en grafeno (materiales grafénicos) [3].	2
Figura 2: Esquema de la obtención del grafeno mediante los métodos top-down y bottom-up [3]	3
Figura 3: Uso de los GQDs para la vehicularización de fármacos en el tratamiento del cáncer [18]	7
Figura 4: Esquema del proceso de síntesis llevado a cabo para la obtención de los GOQDs	10
Figura 5: <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>)	11
Figura 6: Esquema de la placa de 96 pocillos empleada durante el experimento de toxicidad in vitro	16
Figura 7: Difractograma de rayos X de la muestra de las nanofibras de CNF y GOQDs	17
Figura 8: Porcentaje de los elementos que componen las nanofibras CNF y los GOQDs.	19
Figura 9: Región C1s deconvolucionada de los espectros XPS de los GOQDs	20
Figura 10: Imágenes TEM de los GOQDs	21
Figura 11: Evolución de la tasa de supervivencia en <i>C.elegans</i> debida a la exposición aguda con GOQDs	22
Figura 12: Evolución de la tasa de supervivencia en <i>C.elegans</i> debida a la exposición crónica con GOQDs	23
Figura 13: Estudio de la viabilidad celular de las células Hep G2 ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días	24
Figura 14: Estudio de la viabilidad celular de las células Caco-2 ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días	25
Figura 15: Estudio de la viabilidad celular de las células SH- SY5Y ante la exposición de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días	26
Figura 16: Comparación de la viabilidad celular de las células SH-SY5Y con las células neuronales ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 5 días.	27
Figura 17: Análisis de la presencia de endotoxinas en la muestra de GOQDs	28
Figura 18: Estudio de la viabilidad celular de los macrófagos ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 5 días	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de células empleadas en los experimentos de toxicidad in vitro dependiendo de la línea celular y del tiempo del experimento.....	15
Tabla 2: Parámetros estructurales determinados por XRD del pico (002) en las CNF y GOQDs.	18
Tabla 3: Componentes del análisis superficial XPS de las fracciones basadas en GOQDs.	20

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
GQD	Puntos cuánticos de grafeno
GOQD	Puntos cuánticos de óxido de grafeno
CNT	Nanotubos de carbono
BLG	Bicapa de grafeno
FLG	Grafeno de pocas capas
MLG	Grafeno multicapa
CNF	Nanofibras de Carbono
GO	Óxido de grafeno
FLGO	Óxido de grafeno de pocas capas
GONF	Nanotubos de carbono oxidado
GNR	Nanocintas de grafeno
hNSC	Células madre neuronales humanas
XRD	Difracción de rayos X
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
C.elegans	Caenorhabditis elegans
NGM	Agar nematode growth media
DMEM	Medio de Dulbecco's eagle modificado
SFB	Suero fetal bovino
ROS	Especies reactivas de oxígeno

1 Introducción y objetivos

1.1 Introducción a los materiales grafénicos

El carbono es uno de los elementos más abundantes de la naturaleza y constituye un pilar básico para la química orgánica y la existencia de la vida. Su descubrimiento se remonta a la antigüedad, siendo uno de los primeros elementos conocidos. Se trata de un no metal tetravalente, por lo que presenta cuatro electrones capaces de formar enlaces químicos covalentes. La relevancia de este elemento reside en la capacidad que tiene de formar distintas estructuras moleculares, conocidas como alótropos de carbono, mediante la combinación entre los átomos de carbono y el tipo de hibridación que presentan sus orbitales (sp^1 , sp^2 y sp^3). Cada alótropo de carbono tiene una estructura molecular diferente al resto, la cual les confiere propiedades físicas, morfológicas y químicas significativamente diferentes, siendo muy interesantes para diversos campos de investigación como la biotecnología o la energía [1].

En la naturaleza, el carbono elemental se puede encontrar como dos alótropos, el diamante y el grafito, que consisten en alargadas redes formadas por la combinación de los átomos de carbono con los orbitales sp^3 y sp^2 , respectivamente. Ambos alótropos muestran propiedades físicas únicas como dureza, elevada conductividad térmica y eléctrica. Debido a dichas propiedades, estos materiales han sido ampliamente estudiados, siendo los únicos alótropos de carbono conocidos durante mucho tiempo. Esta situación cambió con el descubrimiento de los fulerenos en 1985 [2] y años más tarde del grafeno en 2004 [3].

Respecto al alótropo de grafeno, se forma por la combinación de los átomos de carbono mediante hibridación sp^2 y constituye un componente básico estructural para el resto de estructuras grafénicas que se muestran en la Figura 1. Dichas estructuras se denominan materiales grafénicos, los cuales incluyen formas 2D, que se conocen como materiales de grafeno, así como formas 0, 1 y 3D cuyas estructuras se forman a partir de las “capas de grafeno”. Así, en el fullereno (0D), la capa de grafeno se envuelve formando una esfera, en los nanotubos de carbono (CNT, por sus siglas en inglés) (1D) se enrolla formando cilindros y en el grafito (3D) se apila una capa sobre otra de forma paralela.

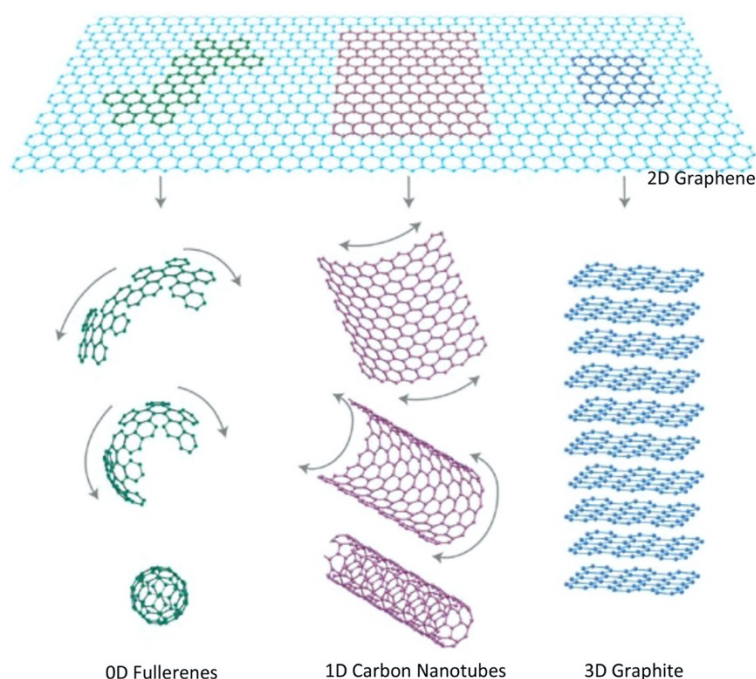


Figura 1: Formas y dimensiones características de los alótropos del carbono basados en grafeno (materiales grafénicos) [3].

1.2 Materiales grafénicos.

La existencia teórica del grafeno fue discutida hace más de 55 años por Slonczewski y Weiss [4]. Años más tarde, Landau, Peierls y Mermin publicaron que la existencia de un material con tales características era prácticamente imposible debido a la inestabilidad termodinámica, una teoría también respaldada por varias observaciones experimentales independientes [5, 6]. Sin embargo, en 2004, Novoselov y Geim lograron aislar láminas individuales de grafeno mediante la escisión micromecánica del grafito (método de cinta adhesiva) [3], y caracterizaron su electrodinámica cuántica [7].

El grafeno monocapa es un teselado hexagonal plano (2D) formado por la combinación de los átomos de carbono con los orbitales sp^2 , mediante enlaces químicamente covalentes. Los átomos de carbono presentan cuatro electrones de valencia en el estado hibridado, tres de ellos se encuentran alojados en los híbridos sp^2 formando el esqueleto de la estructura del grafeno, y uno alojado en un orbital atómico tipo $\langle p \rangle$, perpendicular al plano de los híbridos.

Existen una gran cantidad de materiales basados en grafeno y carbono bidimensional. Estos materiales se pueden clasificar teniendo en cuenta distintas características como son: el número de capas, la dimensión lateral, la dislocación rotacional entre capas o la modificación química. Una forma habitual de clasificarlos es según el número de capas, donde se tiene:

“grafeno” o “monocapa de grafeno” para capas aisladas de grafeno; “grafeno bicapa” (BLG, por sus siglas en inglés), constituido por dos capas de grafeno apiladas; “grafeno de pocas capas” (FLG, por sus siglas en inglés), con un número de capas comprendido entre 2 y 5; y “grafeno multicapa” (MLG, por sus siglas en inglés), de 2 a 10 capas de grafeno. Otra forma bastante empleada de clasificarlos es según las modificaciones químicas, donde existen ejemplos como el “óxido de grafeno” (GO, por sus siglas en inglés) u “óxido de grafeno de pocas capas” (FLGO, por sus siglas en inglés), que se preparan mediante un proceso de oxidación y exfoliación. Entrando en consideraciones de tamaño, existen grafenos con dimensiones laterales del orden de los 100 nm o menores, denominados “nanohojas de grafeno”. También existen otros materiales aislados de grafeno como las “nanocintas de grafeno” (GNR, por sus siglas en inglés) o los “puntos cuánticos de grafeno” (GQD, por sus siglas en inglés). Las GNR presentan una longitud lateral mayor que su anchura, que a su vez es inferior a los 100 nm para poder llevar el prefijo “nano”, mientras que los GQD presentan dimensiones laterales muy pequeñas, menores a 10 nm.

La obtención de los materiales de grafeno se produce a partir de dos estrategias químicas denominadas: *Top-down* (de arriba abajo) y *Bottom-up* (de abajo a arriba), como se muestra en la Figura 2. En las estrategias *top-down* se parte del material grafénico y se aísla el material de grafeno bidimensional [3]. Por otro lado, en las estrategias *bottom-up* se obtiene el grafeno a partir de la estructuración de los átomos de carbono [8]. La elección de una u otra estrategia de producción es determinante para cada tipo de material y por consiguiente, para la aplicación a la que vaya destinado, ya que condiciona características tan importantes como la calidad del material, el tipo de defecto o de sustrato.



Figura 2: Esquema de la obtención del grafeno mediante los métodos top-down y bottom-up [3]

Respecto a las propiedades de los materiales grafénicos, se han llegado a sintetizar materiales grafénicos cuyas propiedades han superado a las del resto de materiales conocidos. Este material exhibe una movilidad de carga extremadamente alta ($10^5 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) incluso a temperatura ambiente junto con una elevadísima conductividad térmica ($\sim 5000 \text{ Wm K}^{-1}$) [9]. Respecto a su elevada conducción eléctrica (10^6 S cm^{-1}), el grafeno puede resistir densidades de corriente de 10^8 A cm^{-2} , siendo varias órdenes de magnitud mayores que en el caso del cobre [3]. Además, el grafeno monocapa presenta una banda de gap cero, lo que implica que los electrones pueden saltar sin impedimentos energéticos de la capa de valencia a la capa de conducción y facilitar en gran medida la conducción eléctrica. Otra propiedad a resaltar es su capacidad de absorber un 2,3% de la luz en una amplia gama del espectro visible, permitiendo así que sea un material transparente. También destaca por su extrema delgadez, lo que le da cierta flexibilidad. Sin embargo, esta flexibilidad no impide que sea uno de los materiales con más alto módulo de Young, situándose en 1 TPa. [10].

Estas excepcionales propiedades consiguen que dichos materiales puedan ser empleados en multitud de aplicaciones [11]. Entre todas ellas destaca su uso en la industria electrónica y optoelectrónica, almacenamiento y conversión de energía, pinturas y recubrimientos, dispositivos termoelectrónicos y materiales de interfaz térmica, sensores y, biotecnología y biomedicina.

1.3 Puntos cuánticos de grafeno.

Los puntos cuánticos de grafeno conocidos como "*graphene quantum dots*" (GQD) en inglés, han surgido muy recientemente dentro de la familia de los materiales grafénicos. Al igual que el grafeno, los GQDs muestran unas propiedades excelentes y únicas que han conseguido atraer la atención de numerosas investigaciones en varios campos de aplicación [12, 13].

Los GQDs son estructuras cero dimensionales (0D), con una distribución de átomos de carbono en forma de anillos hexagonales, como ocurre en el grafeno. Se caracterizan por ser nanopartículas fotoluminiscentes, formadas a partir de láminas de grafeno con geometría circular plana, de un tamaño muy pequeño, típicamente entre 3–20 nm, aunque pueden alcanzar tamaños laterales de hasta 80 nm [14]. La capacidad de ser fotoluminiscentes los diferencia del grafeno, ya que al tratarse de un material con banda prohibida cero, no presenta tal propiedad. La aparición de esta propiedad en los GQDs se debe a que el radio de Bohr en el grafeno es infinito, lo que permite que fragmentos de cualquier tamaño puedan presentar efectos de confinamiento cuántico [15], dando lugar así a una banda prohibida distinta a cero y

a propiedades fotoluminiscentes muy interesantes. Por esto, la anchura de la banda prohibida puede variarse modificando el tamaño y la química superficial de los GQDs, lo que altera tanto los efectos de borde como el confinamiento cuántico, acentuándose en muestras más pequeñas y con bordes de tipo zigzag. Respecto a los efectos de borde, los grupos funcionales que se encuentran en los extremos o en la superficie de los GQDs son capaces de introducir características de absorción adicionales, influyendo en la propia fotoluminiscencia del material. Por lo que, la intercalación de oxígeno en el grafeno que presenta un tamaño con efecto cuántico, como en los puntos cuánticos de óxido de grafeno (GOQDs, por sus siglas en inglés), afectaría a su fotoluminiscencia, pudiendo ser modulada en función de la extensión de la oxidación. Sin embargo, este proceso de fotoluminiscencia no es completamente reversible mediante este tipo de tratamientos debido a los cambios que sufre la estructura atómica del grafeno [16].

Respecto a la síntesis, se pueden obtener siguiendo las dos estrategias descritas anteriormente para el grafeno, (las rutas descendentes o *Top-down*, o las síntesis ascendentes o *Bottom-up*). Bajo el marco de estas dos estrategias se engloban una gran cantidad de métodos y técnicas que permiten sintetizar GQDs empleando una amplia variedad de precursores como fibras de carbono, grafito, nanotubos de carbono y grafeno (en las rutas *Top-down*) y ácido cítrico, glucosa y ácido L- glutámico (en las síntesis de tipo *Bottom-up*).

Sus magníficas propiedades hacen que sean una herramienta muy útil en el desarrollo de aplicaciones en diversos sectores [17], permitiendo el desarrollo de nuevos y mejorados dispositivos eléctricos, optoelectrónicos, otovoltáicos y de almacenamiento de energía. Su aplicación también se extiende hasta el ámbito de la biomedicina, y la monitorización ambiental, aplicándose a sensores y biosensores, y utilizándose como agente de contraste para la obtención de bioimágenes.

1.3.1 Aplicación en el ámbito biomédico

Los GQDs han atraído una atención creciente en el campo de la investigación biomédica debido a sus propiedades fisicoquímicas, ópticas y mecánicas [18]. Si se comparan con otros materiales, como los GO, los GQDs muestran una excelente biocompatibilidad, una alta fotoluminiscencia intrínseca, solubilidad en agua y una gran área superficial. Además, pueden ser sintetizados a partir de compuestos orgánicos de bajo coste, obteniendo un alto rendimiento de producto [19]. Otra propiedad que los caracteriza es la alta relación superficie/volumen, que junto a la elevada capacidad de carga, permite que los GQDs pueden interactuar con

medicamentos y otras biomoléculas. Esta capacidad de interacción hace posible que, con la modificación adecuada de la superficie, pueden emplearse para la entrega de genes y fármacos. Su aplicación no solo se limita a actuar como portadores, sino que además la capacidad que tienen de ser fotoluminiscentes, obtenida gracias al efecto del confinamiento cuántico y a la estructura de borde, les permite ser empleados en bioimágenes y biosensores. Dentro de este campo, los GQDs presentan una mayor estabilidad fotográfica y son menos tóxicos que otros materiales ya empleados como son los tintes orgánicos de baja emisión [20].

Respecto a su capacidad de implementación en el campo biomédico, el grupo de Yujia Jing de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Shanghái (China) ha liderado uno de los principales esfuerzos en este campo [21]. En sus estudios, han desarrollado una capsula multifuncional que tiene como objetivo principal capturar imágenes mediante fluorescencia. La utilización de los GQDs en este estudio no sólo ha permitido que se puedan formar imágenes mediante fluorescencia, sino que también ha permitido que sean empleados como marcadores dirigidos para la liberación de determinados fármacos contenidos en la capsula. Posteriormente, el grupo de Xu-Wei Chen del Centro de Investigación en Ciencias Analíticas de Shenyang (China) ha sintetizado GQDs recubiertos por recubrimientos híbridos de SiO_2 (GQDS-HQD) [22]. Estos GQDs presentan los beneficios de ambos materiales, exhibiendo una excelente estabilidad y fluorescencia, así como una enorme capacidad de cargar diferentes fármacos. Por otro lado, se ha demostrado que los GQDs son capaces de actuar como portadores de fármacos anticancerígenos (Figura 3) y a su vez, como potenciadores de la actividad de escisión del ADN, lo que debería ser útil en la terapia contra el cáncer [18]. Otro campo donde los GQDs han tenido últimamente mucha relevancia es en la ingeniería de tejidos. El grupo de Jichuan Qiu del Instituto de Investigación Biotecnológica de Hong Kong (China) se ha encargado de investigar el efecto de los GQDs en la diferenciación ontogénica de las células madre mesénquimales, obteniendo resultados muy prometedores [23].

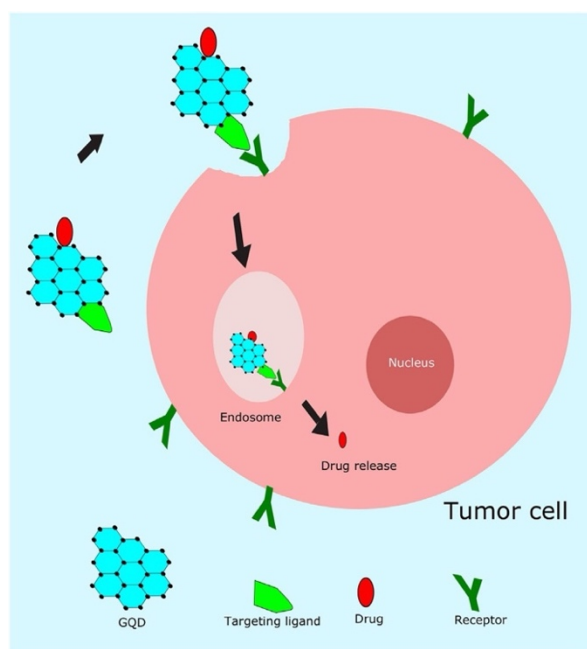


Figura 3: Uso de los GQDs para la vehicularización de fármacos en el tratamiento del cáncer [18]

1.3.2 Toxicidad

La toxicidad de los nanomateriales es uno de los principales desafíos al que hay que enfrentarse para su empleo a nivel biomédico. Aunque la aplicación de los GQDs pueda generar desarrollos y mejoras en el campo de la biomedicina, nunca podrían utilizarse si suponen una amenaza para la salud humana; por tanto, es necesario una profunda investigación acerca de la toxicidad de estos materiales. Recientemente, el grupo de Yu Chong del Laboratorio de Nanomedicina de la Universidad de Suzhou (China) ha estudiado la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los GQDs [24]. Respecto a sus experimentos de biodistribución *in vivo*, no se ha llegado a encontrar ninguna acumulación de material en los órganos vitales de los ratones. Esto contrasta con lo que ocurría cuando se trabajaba con GO, donde se podía observar manchas oscuras formadas por la acumulación de las nanopartículas tanto en el hígado como en el bazo del ratón. El grupo de Tiantian Wang del Instituto de Química Aplicada de Changchun (China) ha analizado los efectos tóxicos de los GQDs en los glóbulos rojos [25]. Gracias a ello, se ha conocido que los GQDs alteran la estructura y conformación del lípido, siendo la primera investigación que revela el mecanismo de toxicidad de los GQDs en los glóbulos rojos. Por otro lado, el grupo de Weihua Shang del Departamento de Química de la Universidad de Beijing (China) ha observado las interacciones entre los GQDs y las células madre neuronales humanas (hNSC) [26]. Sus estudios se han centrado en analizar el mecanismo de captación de los GQDs por las hNSC, llegando a

examinar sus efectos sobre la proliferación y la actividad metabólica de las hNSC, sin encontrar cambios sustanciales en la viabilidad celular, la proliferación, la actividad metabólica y el potencial de las células madre. Respecto a la toxicidad biológica, todavía no existen estudios que hayan profundizado acerca de la toxicidad ambiental de los GQDs.

Todos los estudios mencionados anteriormente han servido para establecer las bases acerca de la toxicidad de los nanomateriales GQDs. Sin embargo, estos estudios resultan escasos si se tiene en cuenta la cantidad de factores que pueden influir tanto en la biocompatibilidad como en la toxicidad de los nanomateriales. Entre todos estos factores destacan el tipo de síntesis, los grupos funcionales, el tamaño, la conductividad, la naturaleza de las modificaciones químicas y también la línea celular y las moléculas del fármaco. Es por ello que el presente trabajo se centró en el estudio de la toxicidad *in vivo* e *in vitro* producida por los GQDs, y más concretamente, por los GOQDs. Este nanomaterial es muy similar a los GQDs pero presenta una mejor fotoluminiscencia obtenida gracias a la implementación de grupos oxigenados en su superficie, haciéndolos idóneos para aplicaciones biomédicas. A pesar de esta mejoría, apenas existen investigadores que hayan analizado la toxicidad *in vivo* e *in vitro* de este tipo de nanomaterial. Por lo que son necesarios este tipo de estudios para poder identificar de manera clara el mecanismo de toxicidad que llevan a cabo.

1.4 Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es analizar la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los materiales grafénicos GOQDs, para evaluar su viabilidad en aplicaciones biomédicas.

Para este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos intermedios:

- 1) Síntesis de los GOQDs partiendo de nanofibras de carbono (CNF, por sus siglas en inglés) mediante el proceso de oxidación/exfoliación (estrategia *top-down*).
- 2) Caracterización del nanomaterial sintetizado mediante diferentes técnicas analíticas: XRD, Análisis elemental, XPS y TEM.
- 3) Estudio de la toxicidad ambiental *in vivo* mediante el empleo de *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*).
- 4) Estudio de la toxicidad *in vitro* en distintas líneas celulares de órganos del sistema digestivo (hepáticas e intestinales) y neuronal (neuroblastoma y neuronales).
- 5) Estudio de la toxicidad inmunológica empleando macrófagos.

2 Parte Experimental

Todos los reactivos utilizados para el proceso de síntesis aparecen descritos en el ANEXO I.

2.1 Síntesis de los GOQDs

Los GOQDs se sintetizaron a partir de nanofibras de carbono (CNF, por sus siglas en inglés) de tipo fishbone mediante oxidación química por el método de Hummer's modificado [27] y posterior se les realizó una exfoliación ultrasónica. Este protocolo de síntesis fue previamente desarrollado en el Grupo de Conversión de Combustibles (ICB-CSIC) [28]. En la síntesis, se partió de 3 g de CNF que se mezclaron con 3 g de NaNO_3 (99.0%) y 138 ml de H_2SO_4 (96%) bajo agitación y en baño de hielo. Después se añadió 26 g de KMnO_4 poco a poco y bajo agitación vigorosa. Durante esta etapa la temperatura se mantuvo por debajo de los 20 °C. Tras añadir todo el permanganato, se mantuvo la disolución en reposo durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, la solución resultante se dejó bajo agitación a 30 ± 5 °C durante 2h y a temperatura ambiente durante toda la noche. Finalizada la oxidación, se obtuvo una mezcla pastosa de color marrón. Después se añadieron muy lentamente 240 ml de agua desionizada (mili-Q) evitando superar los 70 °C en la solución, debido a que la reacción con el ácido sulfúrico es exotérmica. Transcurrida 1h de agitación, se adicionaron otros 600 ml de agua desionizada (mili-Q). Tras la dilución, el exceso de iones permanganato se consumió añadiendo gota a gota 26 ml de H_2O_2 (33%), uno por cada gramo de KMnO_4 añadido en la oxidación. El material resultante de la oxidación, de color negro, se exfolió mediante sonicación durante 4h y se centrifugó (Beckman Coulter, Allegra X-22R) a 9500 rpm y 4°C durante 40 min. Tras este proceso se obtuvo una suspensión de materiales de óxido de grafeno formada por CNF oxidadas (GONF, por sus siglas en inglés), óxidos de grafeno de pocas capas (FLGO, por sus siglas en inglés) y GOQDs, cuya distribución depende del rendimiento del proceso de oxidación/exfoliación. El precipitado se lavó varias veces con una disolución diluída de HCl (10%). Las diferentes fracciones se separaron mediante una secuencia de centrifugaciones diferenciales degresivas. Para ello el precipitado se redispersó en agua desionizada (mili-Q) y se sometió a varios ciclos de centrifugación de 60 min en etapas de velocidades descendentes (14800, 9500, 7000 y 4500 rpm) usando en cada una el precipitado redispersado en agua de la etapa anterior y separando el sobrenadante obtenido en cada una de ellas en orden de tamaños de partícula decreciente (Figura 4). Tras la centrifugación, la fracción de GOQD obtenida presentó una concentración en torno a 0,1-0,6 mg ml⁻¹.

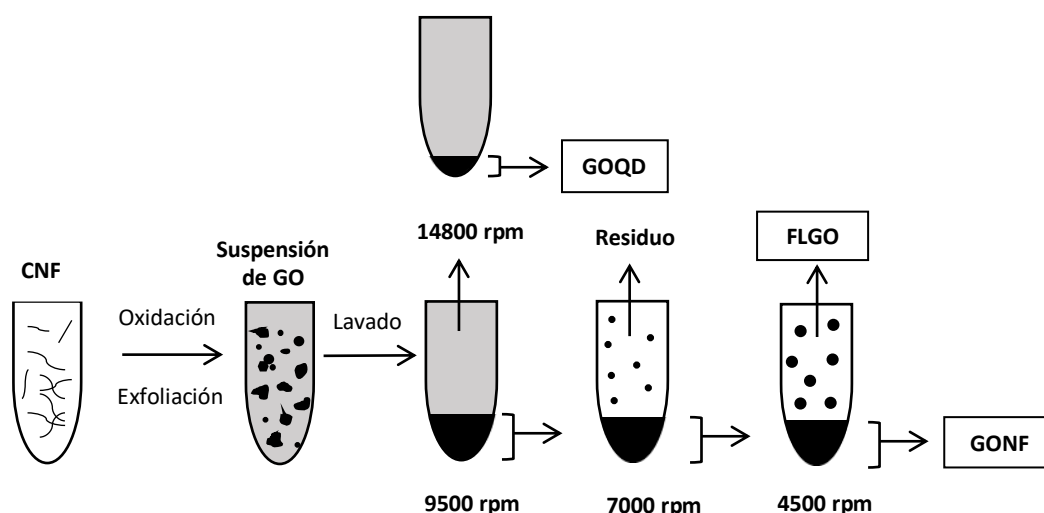


Figura 4: Esquema del proceso de síntesis llevado a cabo para la obtención de los GOQDs

2.2 Técnicas de caracterización.

El fundamento teórico de las técnicas de caracterización empleadas se encuentra descrito en el Anexo II.

2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se puede conocer la morfología y el tamaño promedio de los GOQDs sintetizados. Para la realización del análisis fue necesario preparar previamente la muestra por dispersión en agua mediante ultrasonidos. Las imágenes de TEM se obtuvieron en el microscopio Tecnai F30 (FEI company) operado en modos TEM y STEM, con una aceleración del voltaje de 300 kV. El instrumento estaba equipado con un emisor de campo y lentes SuperTwin® que permite una resolución máxima de 1.5 Å.

2.2.2 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (XRD) permite conocer la estructura cristalina presente en los GODQs. El patrón de difracción se adquiere con un difractómetro Bruker (Modelo D8 Advance, Series 2) con un modo de escaneo por etapas (rango de ángulo $2\theta=5^{\circ}$ - 80° , tamaño de paso $=0,05^{\circ}$, tiempo de conteo=4s/paso), usando como fuente de rayos X un ánodo de cobre ($\lambda=1,54$ Å) y un monocromador secundario de grafito, operado a 40,0 kV y 30,0 mA.

2.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

La espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) permite determinar con precisión la composición atómica más superficial de los GODQs. El análisis se realizó mediante un sistema Omicron ESCAPlus, equipado con un analizador de energía de electrones hemisférico, con un ánodo no monocromatizado de Mg ($\lambda=1253,6$ eV) como fuente de radiación, operado a 15 mA y 15 kV, a vacío ($<5 \times 10^{-9}$ torr).

2.2.4 Análisis Elemental.

El análisis elemental es una técnica de caracterización que permite determinar de manera cuantitativa y cualitativa el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en los GODQs. Esta técnica analítica se utilizó para confirmar la composición de los materiales analizados. Se empleó un analizador Thermo Flash 1112 para la determinación de dichos elementos en un rango entre el 0,05% y 99,95%, que cumple las normas EN establecidas.

2.3 Materiales y métodos.

2.3.1 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) son unos nematodos que habitan en el suelo y que se alimentan de poblaciones fúngicas y bacterianas (Figura 5). La capacidad de criar cientos de gusanos en una sola placa de Petri, su transparencia, su ciclo de vida rápido (3 días), su vida útil corta (3 semanas) y, su crecimiento fácil y económico han hecho de este gusano un modelo ideal para trabajar en el laboratorio. Además, los avances en genética y biología molecular han permitido la identificación de todas las células de *C.elegans* y su genoma completo, lo que ha demostrado una alta conservación de los mecanismos biológicos entre el gusano y los vertebrados, siendo idóneos como modelos *in vivo*.



Figura 5: *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

La cepa de *C.elegans* que se utilizó durante los experimentos de toxicidad ambiental presentaba la mutación *glp-4*. Esta mutación produce que los gusanos sean incapaces de generar prole cuando son cultivados a 25 °C. Este hecho permitió realizar los experimentos de supervivencia sin que aparecieran anomalías en el recuento de los gusanos. Todas las cepas de *C.elegans* provinieron del Centro de Genética Caenorhabditis (Universidad de Minnesota).

La presencia de gusanos en diferentes etapas de desarrollo dentro de los cultivos impide la obtención de resultados veraces de los estudios de toxicidad. Por ello, fue necesario someterlos a un proceso de sincronización con el objetivo de obtener una población de gusanos que se encontrará en la misma fase o etapa vital. El proceso de sincronización consistió en matar larvas y gusanos adultos, debilitando la cutícula de los *C. elegans* a través de una solución de lejía y sosa cáustica, lo que permitió liberar los huevos del interior de los gusanos que se encontraban en periodo de gestación. Estos huevos resistían condiciones más duras que los gusanos, por lo que se obtuvieron huevos viables a través del uso de una solución de lejía y sosa a una concentración adecuada. Un factor importante fue verificar en un estereomicroscopio la presencia en los cultivos de gusanos en gestación para poder seleccionar el mejor día para realizar la sincronización, y para así obtener el máximo número de huevos. Otros parámetros, como la relación entre la cantidad total de gusanos y la cantidad de hidróxido de sodio presente en la solución, el tiempo de contacto entre los gusanos, y la solución de lejía y sosa, la temperatura y la aireación de los huevos también afectaron al rendimiento de obtención de los huevos.

El cultivo de *C.elegans* y el proceso de sincronización aparece descrito de manera detallada en el Anexo III (Apartado 3.1).

2.3.2 Cultivos celulares

Para el análisis de la toxicidad *in vitro* se utilizaron las siguientes líneas celulares tumorales:

1. SH-SY5Y: Línea celular de neuroblastoma
2. Hep G2: Línea celular de carcinoma hepatocelular.
3. Caco-2: Línea celular de adenocarcinoma colorrectal.

Las líneas celulares que se utilizaron en los experimentos fueron adherentes y su manipulación se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Telstar). La línea celular SH-SY5Y se eligió debido a la escasos estudios existentes sobre cómo afecta la presencia de nanopartículas de grafeno en el tejido neuronal. También se utilizaron células neuronales, obtenidas mediante la diferenciación de las SH-SY5Y utilizando ácido retinoico. Por otro lado, las líneas Hep G2 y Caco-2 se seleccionaron debido a que ambas forman parte del

tejido de órganos del sistema digestivo, por lo que permitirían analizar la afección que producen las nanopartículas cuando son introducidas por vía gastrointestinal.

El mantenimiento de estos cultivos, el proceso de congelación y descongelación de los mismos, y la determinación de la densidad celular aparecen explicados en profundidad en el Anexo III (Apartado 3.2).

2.3.3 Macrófagos

Los macrófagos forman parte de las células que constituyen el sistema inmune, por lo que analizar como afectan los GOQDs a estas células da información de cómo el sistema inmune reacciona ante la presencia en el organismo de las nanopartículas de grafeno. Para la obtención de los macrófagos, se partió de una capa leucocitaria o “*buffy coat*” procedente del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Esta capa fue sometida a un proceso de centrifugación en gradiente de Ficoll con el objetivo de extraer las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Una vez extraídas se diferenciaron a macrófagos mediante el proceso que aparece descrito en el Anexo III (Apartado 3.3).

2.3.4 Estudio de la toxicidad ambiental *in vivo*

La toxicidad ambiental *in vivo* producida por los GOQDs en *C.elegans* se analizó tras una exposición aguda (5 días) y crónica (25 días). Los gusanos, ya sometidos al proceso de sincronización, se recogieron de la placa de agar *nematode growth media* (NGM) de 60 mm, donde se encontraban cultivados, mediante el lavado con 6 ml de tampón M9 (Na_2HPO_4 , 6g; NaCl, 5g; KH_2PO_4 , 3g; H_2O destilada, 1l y 1 ml de MgSO_4 1M). La suspensión de gusanos se transfirió a un Falcon de 15 ml. Para incrementar el número de gusanos obtenidos, se realizó otro lavado de la placa de agar NGM con 4 ml de tampón M9. Una vez realizado ese segundo lavado, la suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante resultante se desechó reduciendo el volumen hasta los 2 ml. Los gusanos se resuspendieron mediante vorteo manual y a continuación, se extrajo una alícuota de 20 μl para cuantificar el número de gusanos presentes en la suspensión. El recuento de los gusanos se realizó empleando un estereomicroscopio, siendo necesario introducir la alícuota en un pocillo de una placa de 96. Una vez realizado, se extrapolaron los resultados con el objetivo de conocer el número total de gusanos presentes en los 2 ml.

Para la realización del estudio, se añadieron 30 gusanos a cada placa de agar NGM de 35mm, necesitando un total de 120 gusanos, debido a que en cada experimento se analizaron dos situaciones (presencia de GOQDs y control) por duplicado. El resto de gusanos se volvieron a cultivar en una placa de agar de 60 mm, para poder ser utilizados en futuros experimentos. A continuación, se adicionaron a dos de las placas 40 μ l de GOQDs a una concentración de 37 μ g/ml, junto con 200 μ l de *E. Coli* OP50 que se empleó como fuente de alimento para los gusanos. Las otras dos placas de agar fueron el control, por lo que se les añadió solamente 200 μ l de *E. Coli* OP50. En el caso de los estudios de toxicidad crónica, la adición a cada placa de *E. Coli* y GOQDs se realizó de forma periódica cada 5 días mientras que en los estudios de toxicidad aguda, sólo se realizó el día 1. La evaluación del número de gusanos en cada placa se llevó a cabo de manera diaria, durante el periodo que duró el estudio, con la ayuda de un estereomicroscopio.

Los resultados aparecen expuestos como tasa de supervivencia respecto al tiempo de exposición empleado.

2.3.5 Estudio de la toxicidad *in vitro*.

Las líneas celulares, que se encuentran adheridas a la superficie de los frascos de cultivo de 25 cm² (TPP), se despegaron de la superficie mediante la incubación con tripsina a 37 °C durante 5 min. Finalizado este periodo, con el fin de inactivar la tripsina se añadieron 5 ml de medio de cultivo *Dulbecco's Eagle* modificado DMEM (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Sigma), L-glutamina 2mM (Pan Biotech GmbH) y antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml, Sigma). A continuación, las células se transfirieron a un Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm. La centrifugación se realizó con el objetivo de eliminar la tripsina presente. El sobrenadante obtenido se desechó y se volvieron a añadir otros 5 ml de medio fresco. Fue importante evitar que las células se encontrasen aglomeradas unas con otras, para ello, se pipeteó varias veces la suspensión contenida en el Falcon. Una vez pipeteada, se tomó una alícuota de 50 μ l con el objetivo de calcular la densidad celular de cada línea empleada.

El estudio de toxicidad *in vitro* se realizó empleando una placa de 96 pocillos donde se cultivaron las distintas líneas celulares (Figura 6). En cada caso, se utilizaron un número total de 32 pocillos (4 columnas x 8 filas). A cada pocillo se añadieron 200 μ l de medio que contenía un número determinado de células. Este número dependía de la línea celular utilizada y de la duración del experimento (3 o 5 días), debido a que se pretendía que en el momento del

recuento existiera el mismo número de células. Antes de adicionar los GOQDs, las células debían estar completamente adheridas a la superficie del fondo del pocillo. Para ello, se dejaron incubando durante 2 horas en un incubador termostatzado a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. Finalizado este periodo, se sacaron del incubador y se adicionaron los GODQs a todas las filas menos a la primera que fue el control. En cada fila se tenían diferentes concentraciones de GOQDs, incrementándose conforme se descendía, siendo cada columna un experimento independiente. La concentración de GOQDs en la segunda fila fue de 0,05 µg/ml, aumentando (2:1) a medida que se descendía hasta los 3,7 µg/ml en la última fila. Para conseguirlo, se añadieron a cada fila 20 µl de una suspensión, previamente preparada, que contenía una concentración de GOQDs diez veces superior a la necesaria. Este valor se debe a que en los pocillos ya había 200 µl de medio, por lo que al adicionar los GOQDs se diluyeron 1:10. Una vez añadidos, se dejó la placa en un incubador termostatzado a 37 °C. El tiempo que permaneció allí dependió del experimento, pudiendo ser de 3 o 5 días. Transcurrido el periodo de incubación, se adicionaron 10 µl de una disolución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 5x10³ µg/ml a todos los pocillos menos a los de la última columna que actuó como blanco. El ensayo se basó en la reducción metabólica del MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazan (compuesto coloreado de color violeta), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Por lo tanto la cantidad de células vivas fue proporcional a la cantidad de formazan producido. Tras la adición, se dejó la placa incubando una hora y a continuación, se centrifugó a 1200 rpm durante 15 min.

Tabla 1: Número de células empleadas en los experimentos de toxicidad in vitro dependiendo de la línea celular y del tiempo del experimento

	3 días	5 días
SH-SY5Y	10.0000	5.000
Neuronal	-	5.000
Hep G2	7.500	4.500
Caco-2	5.000	2.500

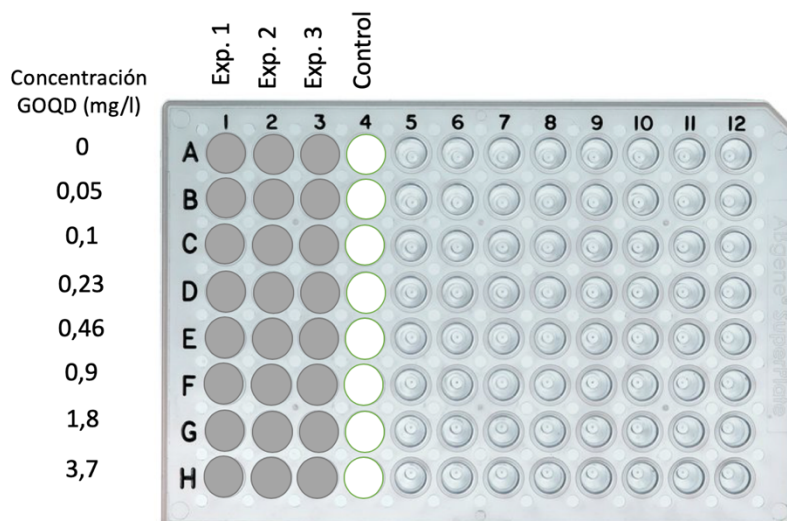


Figura 6: Esquema de la placa de 96 pocillos empleada durante el experimento de toxicidad in vitro

La cuantificación celular se realizó mediante espectrofotometría (Anexo III, Apartado 3.4) a una longitud de onda de 570 nm. Para la elección de la longitud de onda fue necesario realizar un estudio previo con el objetivo de que no interfiriera con el valor de absorbancia producido por los propios GOQDs (Anexo III, Apartado 3.5). La medición de absorbancia se realizó mediante un espectrofotómetro. Este valor dependió de la cantidad de MTT acumulado en las células vivas, de tal forma que, a mayor concentración celular mayor intensidad del color violeta y, por lo tanto, mayor valor de absorbancia (Anexo III, Apartado 3.6).

Los resultados obtenidos se exponen como porcentaje de viabilidad celular respecto de la concentración de GOQDs empleada.

2.3.6 Estudio de la toxicidad inmunológica

El protocolo llevado a cabo para la realización de los ensayos de toxicidad inmunológica fue el mismo que el descrito en el apartado anterior. En este caso, antes de comenzar, fue necesario conocer si había presencia de endotoxinas en los GOQDs. Este tipo de componente actúa estimulando el sistema inmune y generando un potente efecto tóxico, por lo que podía dar lugar a resultados erróneos durante el análisis de la toxicidad de los GOQDs. La detección de la presencia de endotoxinas se realizó empleando el kit *ToxinSensor Endotoxin Detection System* de la casa comercial GenScript y el protocolo que se llevó a cabo aparece descrito de manera detallada en el Anexo III (Apartado 3.7). Respecto al ensayo de toxicidad, se analizó únicamente la toxicidad de los GOQDs en los macrófagos durante un periodo de exposición de 5 días, empleando un número total de 10.000 macrófagos en cada pocillo.

3 Resultados

3.1 Caracterización de los GOQDs

Los difractogramas del análisis XRD de la estructura de las nanofibras CNF de partida junto con del material resultante del proceso de oxidación/exfoliación aparecen descrito en la Figura 7. Las nanofibras CNF presentaron una señal muy pronunciada en torno a $26,4^\circ$, junto con otras minoritarias a $42,5^\circ$, $44,3^\circ$, $53,9^\circ$ y 78° , todas ellas correspondientes a las estructura del grafito hexagonal. Esta señal dominante corresponde al pico del plano de grafito (002), el cual tendió a desaparecer en los GOQDs como consecuencia de la oxidación casi completa del grafito presente en las nanofibras CNF. A partir de la forma y la posición de este pico fue posible determinar el tamaño del cristal (L_c), la distancia entre los planos grafénicos (d) y el número de capas (n), empleando diferentes ecuaciones empíricas (Tabla 2). De este modo, las nanofibras CNF presentaron una estructura apilada, con cristales de grafito con un número medio de capas en torno a 19 y una distancia entre estas capas de 0,33 nm. Tras su oxidación se pudo observar la expansión en esa distancia interplanar (0,362nm), que aumentaba debido a la intercalación de grupos oxigenados, y esto se reflejó en un desplazamiento hacia la izquierda del pico 002. Además, el número de capas de los GOQDs fue mucho más bajo (3,7), ya que el material se había exfoliado, y el tamaño de cristal disminuyó porque la exfoliación los fue rompiendo.

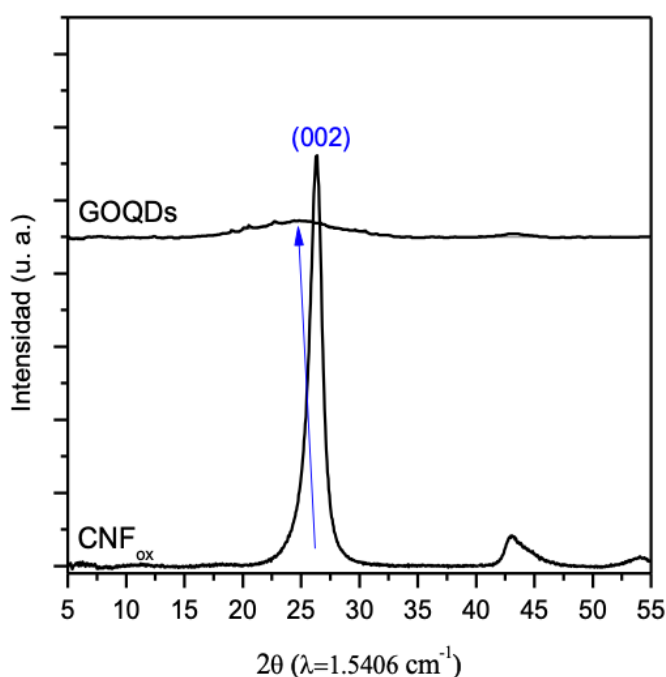


Figura 7: Difractograma de rayos X de la muestra de las nanofibras de CNF y GOQDs

Tabla 2: Parámetros estructurales determinados por XRD del pico (002) en las CNF y GOQDs.

	Posición pico (002) 2 θ (degrees)	Lc (nm)	d (nm)	n
CNF	26,252	6,21	0,339	19,31
GOQDs	24,588	0,97	0,362	3,69

Lc: tamaño de cristal (ecuación de Scherrer)

d: distancia interplanar (ley de Bragg)

n: número de capas ($Lc/d+1$)

En la Figura 8 se muestra la composición química que presentaron las CNF de partida y los GOQDs sintetizados, obtenida mediante análisis elemental. Como se puede observar, la nanofibra de partida estaba compuesta principalmente por carbono (95,62%) y oxígeno en menor cantidad (4,01%). El proceso de oxidación química mediante el método de Hummers modificado introdujo numerosos grupos oxigenados en la red carbonosa, representando hasta el 54,49% del peso de los GOQDs. Este incremento también se vio reflejado en la relación carbono/oxígeno (C/O), siendo de 23,67 para la muestra de CNF y de 0,67 para la de GOQDs. Este último valor se encontró dentro del rango de valores típicos (0,6-0,8) de C/O en GOQDs [29]. Por otro lado, se observó la aparición de N y S en los GOQDs después del tratamiento de oxidación/exfoliación. Este incremento fue debido al uso de NaNO_3 y H_2SO_4 durante el proceso de oxidación. El contenido de N y de S pasó de ser del 0% en la muestra de CNF al 0,16 y 6,09% en la de GOQD, respectivamente.

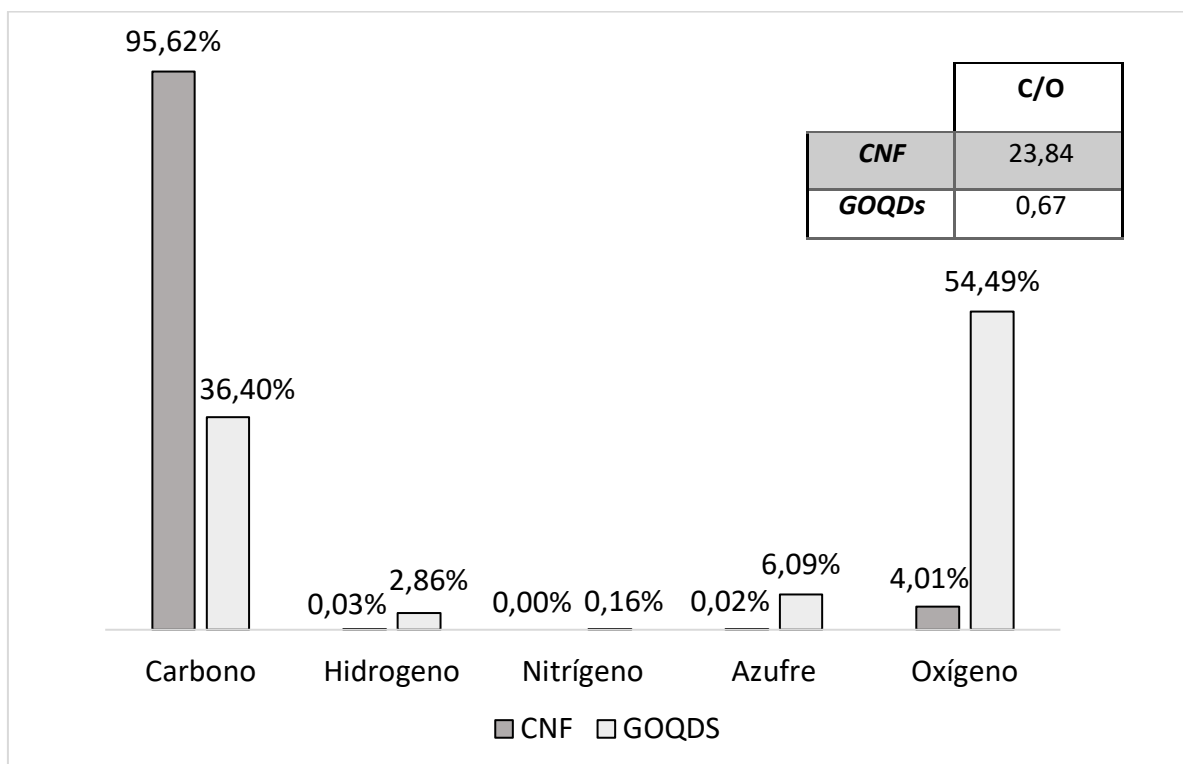


Figura 8: Porcentaje de los elementos que componen las nanofibras CNF y los GOQDs.

El estado químico de los grupos oxigenados de los GOQDs se analizó mediante XPS (Figura 9). En el espectro del orbital C1s (Tabla 2) se apreciaron diferentes picos que podían corresponder a tres grandes grupos: enlaces carbono-carbono (C-C y C=C) a 284.6 eV, enlaces carbono-oxígeno (C-O-C) y (O-C=O) a 286,8 y 288,6 eV, respectivamente, y transiciones $\pi-\pi^*$ a 290,9 eV, cuya contribución relativa se recoge en la Tabla 2. La presencia en el espectro de los picos correspondientes a enlaces carbono-oxígeno se debió al proceso de oxidación llevado a cabo en el material. Durante este proceso, el oxígeno irrumpe en las capas de grafeno de carbono sp^2 dando lugar a grupos en el plano como hidroxilos y epóxidos (C-O-C), y a grupos en el borde como carbonilos y carboxilos (O-C=O). Estos grupos se encuentran intercalados en las superficie y favorecen el proceso de separación de las capas de grafeno, ya que se encargan de abrirlas químicamente [30]. También da lugar a que los GOQDs sean solubles en agua y disolventes polares, lo que es crucial para que puedan ser usados en aplicaciones biológicas [31]. Respecto a los enlaces $\pi-\pi$ que aparecieron en el espectro, en los GOQDs prácticamente fueron despreciables y suelen estar relacionados a los anillos aromáticos presentes.

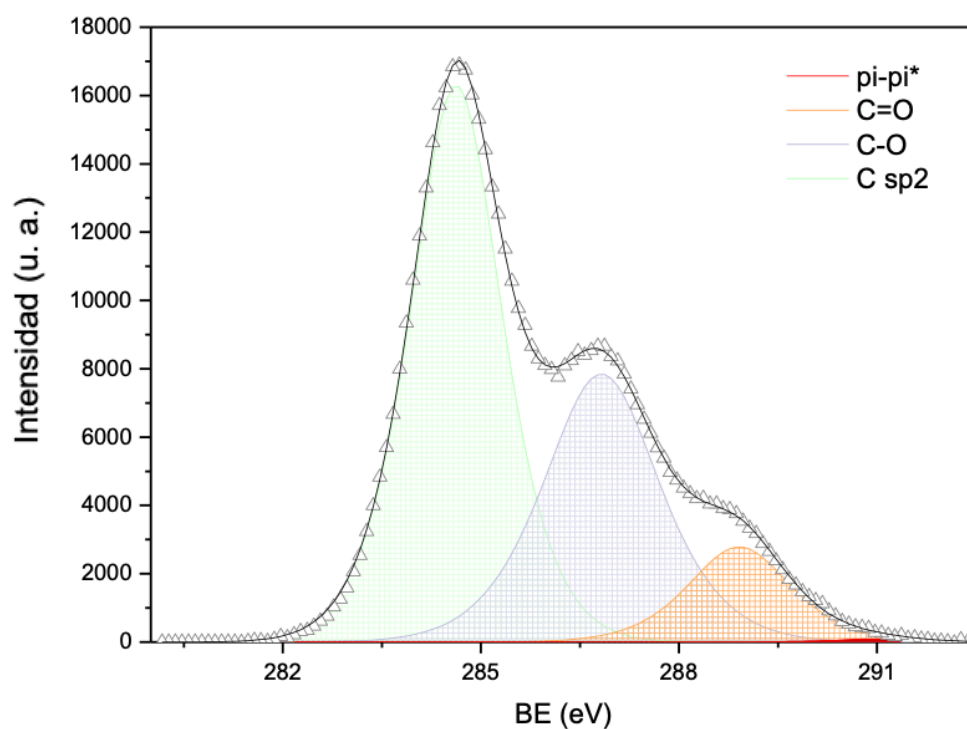


Figura 9: Región C1s deconvolucionada de los espectros XPS de los GOQDs.

Tabla 3: Componentes del análisis superficial XPS de las fracciones basadas en GOQDs.

	C-C/C=C (284,6 eV)	C-O-C; (286,9 eV)	O-C=O (289,0 eV)	C-S (285,2 eV)	π - π^* (291 eV)
CNF	62,90	30,90	2,72	-	3,48
GOQDs	55,55	33,59	10,58	6,77	0,28

El uso de microscopía TEM permitió conocer el tamaño y la forma que presentaban los GOQDs una vez que fueron obtenidos tras el proceso de oxidación/exfoliación de las CNF. Como se puede observar en la Figura 10, dichos materiales presentaban una estructura cristalina formada por pequeños dominios sp² que actuaban como granos superpuestos, dando lugar a varias nanocapas continuas (a modo de membrana). Estas nanocapas se encontraban apiladas unas con otras [32]. El rendimiento en peso de los GOQDs obtenidos se situó entre el 20-25% respecto a las CNF iniciales, lo que representa una gran mejoría en el rendimiento en peso de GOQDs obtenidos a partir de estrategias top-down del grafito, generalmente con valores inferiores al 10% [29].

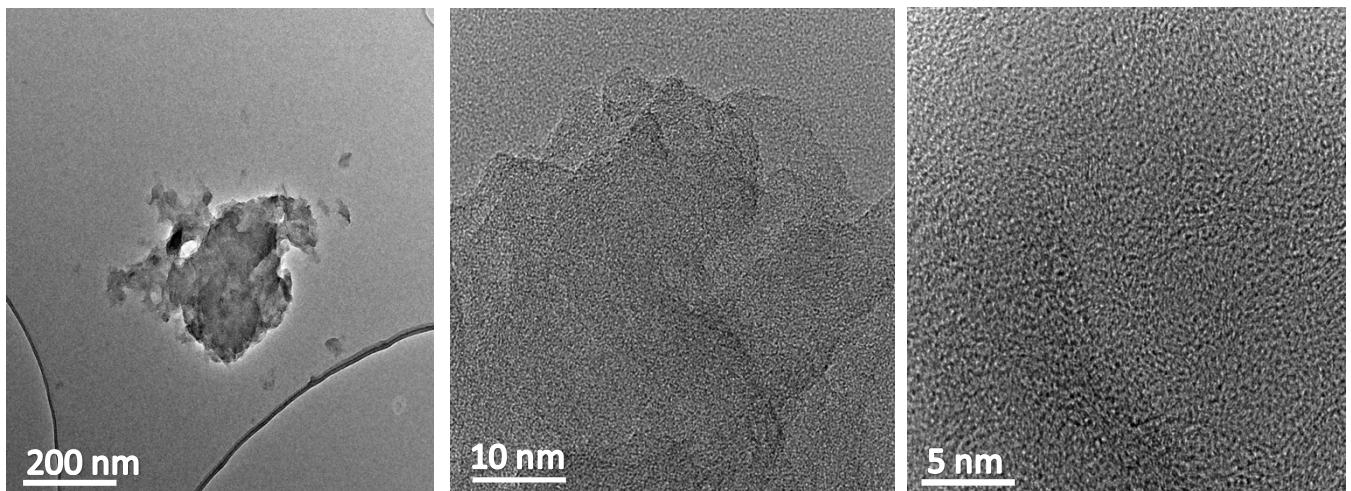


Figura 10: Imágenes TEM de los GOQDs.

3.2 Estudio de la toxicidad ambiental *in vivo*

En la Figura 11 se muestra la evolución de la tasa de supervivencia de los gusanos *C.elegans* cuando fueron sometidos a una exposición aguda (5 días) con GOQDs. A partir de los resultados obtenidos, se observó que la evolución temporal de la tasa de supervivencia de los gusanos que estuvieron en contacto con los GOQDs fue muy similar a la que se producía en el control. Ambas se situaban por encima del 90% transcurridos los 5 días, por lo que se pudo afirmar que a esas concentraciones (37 mg/L) los GOQDS no influyeron ni en la letalidad ni en el desarrollo de los *C.elegans*. Esto se corroboró con los resultados obtenidos por otros autores que también estudiaron el efecto de la exposición aguda de distintos nanomateriales de grafeno, en *C.elegans* [33]. En estos estudios, sólo se observó una disminución sustancial en el comportamiento de la locomoción de los gusanos cuando eran puestos en contacto con concentraciones de nanomaterial superiores a los 100 mg/L.

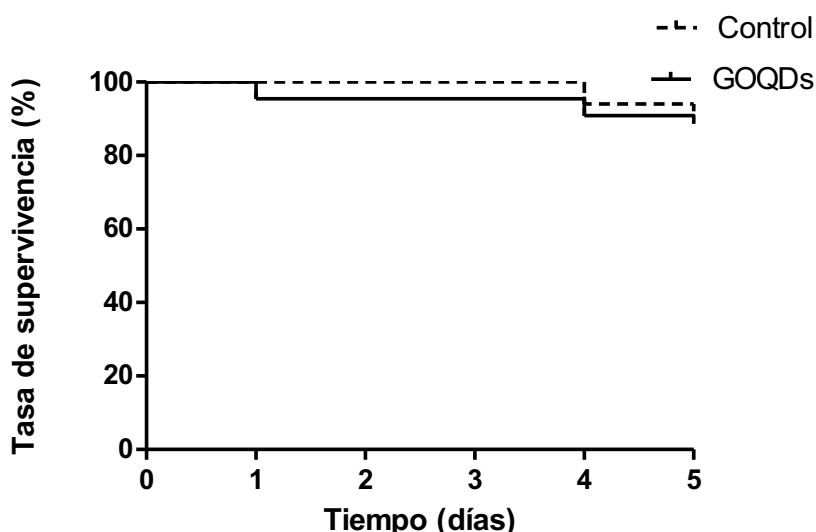


Figura 11: Evolución de la tasa de supervivencia en *C.elegans* debida a la exposición aguda con GOQDs

El efecto producido por la exposición prolongada (25 días) de los gusanos *C.elegans* con GOQDs se muestra en la Figura 12. En este caso, se observó una diferente evolución temporal de la tasa de supervivencia entre el control y la población de gusanos que estuvieron en contacto con los nanomateriales. Hay que destacar que la tasa de supervivencia de la población de gusanos en contacto con los GOQDs fue del 50% al cabo de los 18 días, mientras que en el control se mantuvo en torno al 80% en ese periodo. Por otro lado, al finalizar el experimento la tasa de supervivencia de los gusanos en contacto con los GOQDs fue del 25%, muy inferior a la del control que se situaba en torno al 60%. Estos resultados sugieren que la exposición prolongada a los GOQDs pudo llegar a causar daños a las funciones de los órganos específicos primarios y secundarios de *C.elegans*. Diferentes artículos han evaluado la toxicidad crónica producida por este tipo de nanomaterial a través del impacto que producen sobre el estado de estrés oxidativo, la permeabilidad intestinal y la tasa de defecación en *C.elegans* [34, 35]. En ellos, se ha observado que a concentraciones superiores a los 10 mg/L, los gusanos comienzan a experimentar anomalías en dichos estados. Estas anomalías se han vinculado con la acumulación intestinal de bacterias OP50 (cepa patógena de *E.coli* que actúa como fuente de alimento), cuya presencia puede suprimir los componentes de la respuesta inmune innata de los gusanos. La hipótesis válida que han empleado para explicarlo se basa en la capacidad que tendrían este tipo de materiales para reducir la tasa del ciclo de defecación a través de la perturbación en el desarrollo de las neuronas AVL y DVB que se encargan de regular dicho proceso. Además, mediante el empleo de gusanos transgénicos se ha reportado una disminución significativa en la locomoción de los gusanos que estaban en contacto con GO, siendo materiales muy similares

a los GOQDs [36]. Este hecho respaldaría la noción de que la acumulación intestinal severa de OP50 y la reducción de las capacidades inmunológicas dan lugar a un acortamiento en la vida útil del gusano, como ya se observó en los resultados obtenidos.

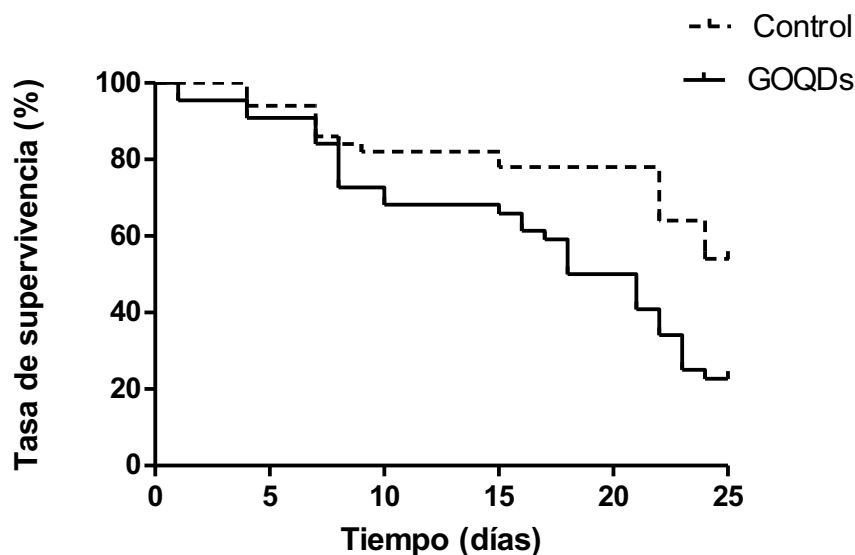


Figura 12: Evolución de la tasa de supervivencia en *C.elegans* debida a la exposición crónica con GOQDs

3.3 Estudio de la toxicidad *in vitro*.

El estudio de la toxicidad que produjeron las distintas concentraciones de GOQDs en las células hepáticas (Hep G2) al cabo de 3 y 5 días de exposición se muestra en la Figura 13. A simple vista se observó que conforme se fue incrementando la concentración de los GOQDs en el cultivo celular, la viabilidad celular fue disminuyendo. Es decir, a mayor concentración de nanopartículas menor fue el número de células vivas que quedaban en el cultivo al finalizar el experimento. También se pudo ver que conforme mayor era el periodo de exposición, mayor fue la caída en la viabilidad celular. Si se observa más detenidamente, las concentraciones que fueron desde los 0,05 a los 0,46 mg/L de GOQDs, presentaron una viabilidad celular muy semejante, situándose en torno a un 85% y 75% a 3 y 5 días, respectivamente. Por el contrario, a partir de la concentración de 0,9 mg/L se produjo una caída muy notable en el número de células vivas, hasta acabar situándose por debajo del 60% a 3 días y del 50% a 5 días a una concentración de 3,7 mg/L de GOQDs. La mayor caída a partir de la concentración de 0,9 mg/L indicó la concentración de GOQDs a partir de la cuál las células empezaron a ser sensibles a la presencia de estas nanopartículas. Algunos investigadores han comprobado que la presencia de este tipo de nanomaterial afecta a la expresión genética de las células Hep G2 debido a la

variación que producen en los ligandos de los que dependen los receptores *aryl hydrocarbon* (AhR) y *pregnane X* (PXR) [37]. Esta variación comienza a producirse conforme se va incrementando la concentración de nanomaterial (< 1 mg/L) y se ha vinculado con el desencadenamiento de mecanismos celulares que conducen a un cierto nivel de autofagia con la consiguiente disminución de los niveles de los receptores anteriormente nombrados y su funcionalidad. La presencia de elevadas concentraciones de GOQDs no sólo se ha relacionado con la aparición de autofagia celular, sino que además estas condiciones se han vinculado con la aparición de estrés mecánico u oxidativo, lo que afectaría a la célula generando especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y pérdida de fluidez celular. Los ROS son un tipo de especie química, químicamente reactiva, que se forma como un subproducto natural del metabolismo del oxígeno [38]. En condiciones normales, facilitan la activación de los factores de transcripción y promueven la diferenciación celular pero si se encuentran altamente concentrados, son capaces de inducir apoptosis y necrosis [37].

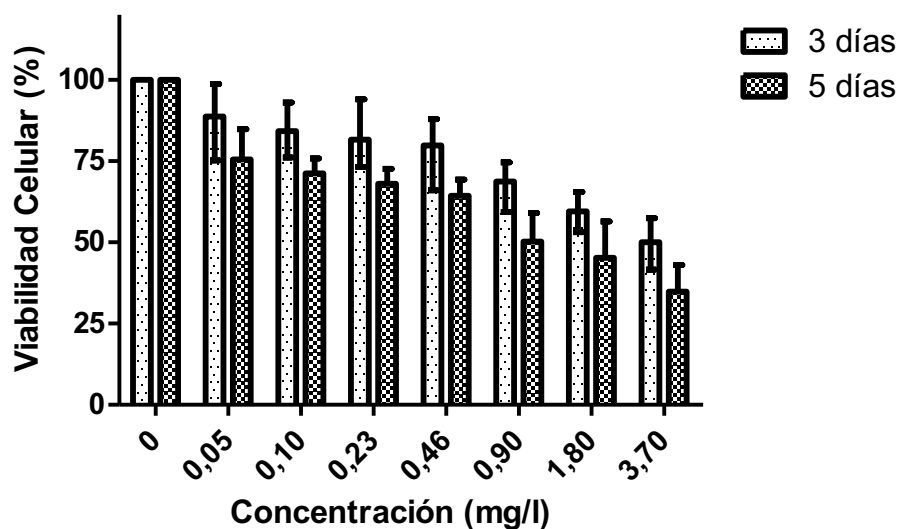


Figura 13: Estudio de la viabilidad celular de las células Hep G2 ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días

En el caso de las células Caco-2, la viabilidad celular apenas se modificó a medida que se aumentó la concentración de GOQDs, situándose siempre en torno al 80% (Figura 14). Este hecho ocurrió tanto en los experimentos realizados durante 3 días como en los realizados durante 5 días, reflejando una gran resistencia de este tipo de células a la presencia de los GOQDs. Otros autores analizaron la capacidad que tendrían los puntos cuánticos de CdSe/ZnS de atravesar la membrana celular de las células Caco-2 [38], observando que a bajas concentraciones ($< 5 \text{ mg/l}$), estos nanomateriales no se detectan ni en la membrana celular ni intracelularmente después de tres días de exposición. Sin embargo, conforme se trabaja con concentraciones más elevadas ($>5 \text{ mg/l}$), la membrana celular comienza a degradarse permitiendo el paso de pequeñas cantidades de nanomaterial al interior de la célula. Estas cantidades serían capaces de producir distintas alteraciones en el interior de la célula como es la generación de ROS, lo que afectaría a las funciones celulares e incluso a alterar el ADN, disminuyendo así la viabilidad celular. Este fenómeno observado usando puntos cuánticos de CdSe/ZnS podría ocurrir también en este estudio, explicando así los resultados obtenidos.

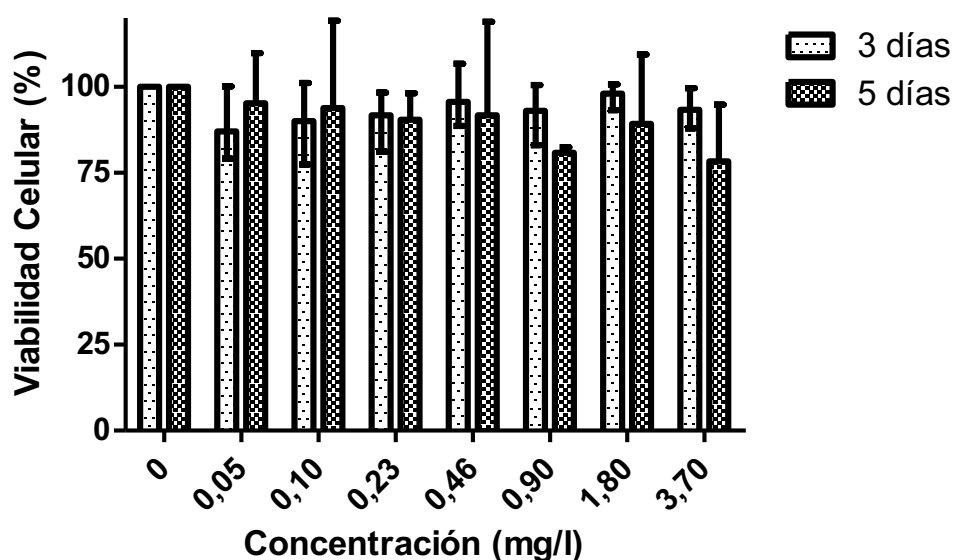


Figura 14: Estudio de la viabilidad celular de las células Caco-2 ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días

En la Figura 15, se muestra el estudio de la toxicidad *in vitro* debida a la presencia de distintas concentraciones de GOQDs en las células de neuroblastoma (SH-SY5Y), realizado durante 3 y 5 días. En él, se observó que la viabilidad celular disminuyó conforme se fue incrementando la concentración de GOQDs. También se apreciaron diferencias entre los experimentos realizados durante 3 y 5 días, obteniendo una menor viabilidad celular en los realizados durante 5 días. Estos resultados reflejan la influencia de la concentración de los GOQDs y del periodo de exposición en la viabilidad de las células SH-SY5Y. La pérdida de la viabilidad celular de las células neuronales (SH-SY5Y) en presencia de los GOQDs se ha atribuido al aumento de la tasa de apoptosis, del Ca^{+2} intracelular y a la liberación de ROS [39]. Respecto al alto nivel de Ca^{+2} intracelular, este se encargaría de estimular la liberación de neurotransmisores como el ácido glutámico, potenciando así la excitabilidad de la respuesta nerviosa y postsináptica. Los neurotransmisores superfluos generados serían capaces de acumularse poco a poco en la hendidura sináptica, influyendo negativamente en el crecimiento y desarrollo neuronal. También hay que destacar que se ha comprobado que el empleo de GOQDs recubiertos de un material antioxidante (NAC) logra reducir de manera drástica estas alteraciones [40], reflejando así la importancia del estrés oxidativo en la neurotoxicidad de estos nanomateriales.

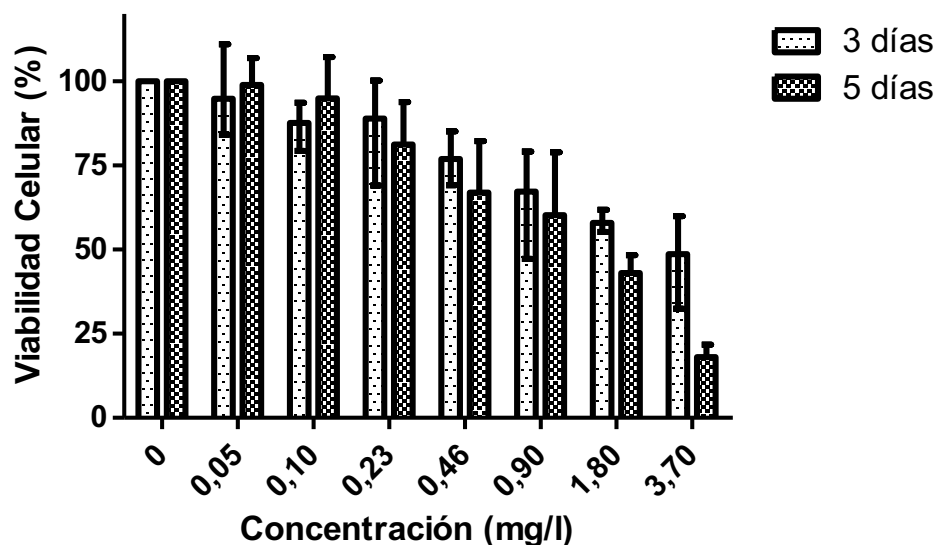


Figura 15: Estudio de la viabilidad celular de las células SH- SY5Y ante la exposición de distintas concentraciones de GOQDs a 3 y 5 días

A continuación, se muestran los resultados de toxicidad obtenidos en las células de neuroblastoma (SH-SY5Y) junto con los obtenidos en las células neuronales a los 5 días de exposición con GOQDs (Figura 16). A partir del análisis de los resultados, se apreció una menor viabilidad celular en las células neuronales, reflejando una mayor sensibilidad a la toxicidad de los GOQDs por parte de las células diferenciadas (neuronales) respecto a las no diferenciadas (SH-SY5Y). Este hecho ocurrió en todas las concentraciones de GOQDs excepto a 3,7 mg/l. La anomalía en este resultado pudo estar relacionada con un error en la medición, ya que, al trabajar a tal concentración, el medio se encontraba bastante saturado de GOQDs, lo que pudo dar lugar a valores erróneos de absorbancia. Para poder comprender esta diferencia, otros autores analizaron la actividad celular de ambas células en presencia de este tipo de nanomaterial durante 48 horas [41], observando que la actividad celular de las células diferenciadas se reduce hasta el 60% debida a la exposición, mientras que la de las células no diferenciadas se mantiene en un 90%.

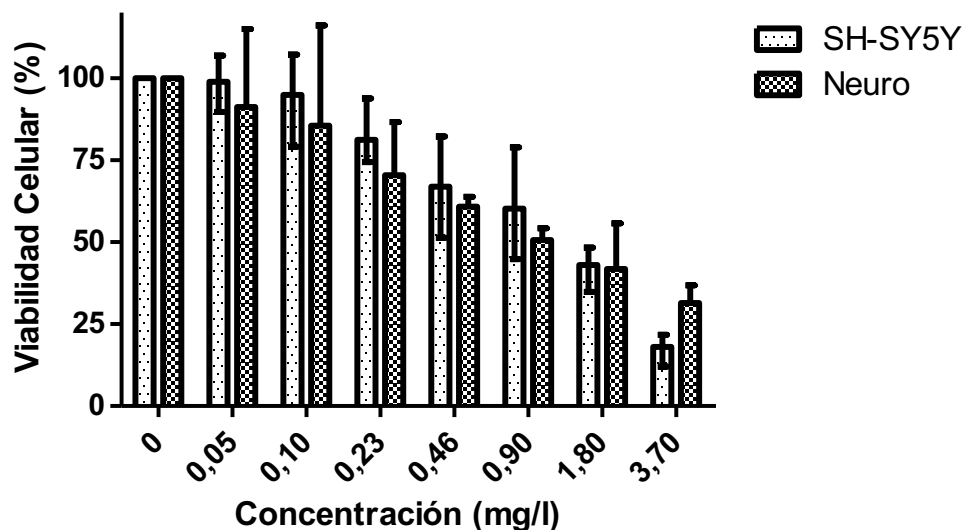


Figura 16: Comparación de la viabilidad celular de las células SH-SY5Y con las células neuronales ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 5 días.

3.4 Estudio de la toxicidad inmunológica

En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos del análisis de la presencia de endotoxinas en las nanomateriales GOQDs (Figura 17). Junto con el valor obtenido de los GOQDs, aparece la recta de calibrado, elaborada de tal forma que se cubre todo el rango de concentraciones de endotoxinas. Interpolando el resultado obtenido en la recta de calibrado, se pudo conocer si la muestra presenta una baja o alta concentración de endotoxinas. En este caso, la concentración de endotoxinas detectada en los GOQDs se encontró muy próxima al menor valor de la recta de calibrado, por lo que, se concluyó que la presencia de endotoxinas en la muestra de GOQDs era mínima.

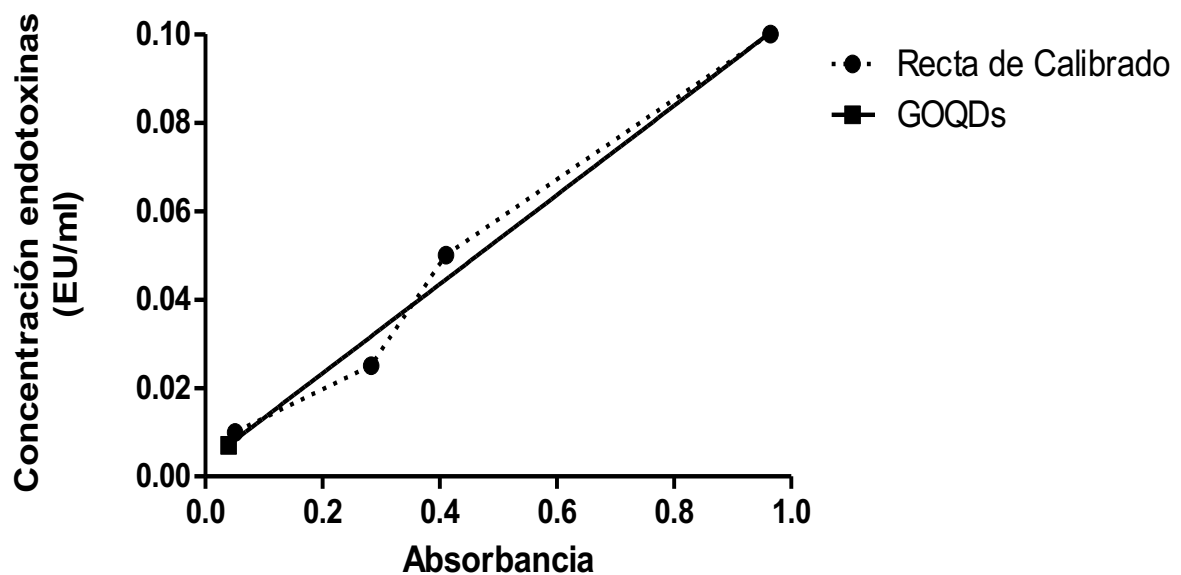


Figura 17: Análisis de la presencia de endotoxinas en la muestra de GOQDs.

Una vez que se conoció que no había presencia de endotoxinas en el nanomaterial, se analizó la toxicidad producida en los macrófagos debida a la exposición con GOQDs durante 5 días (Figura 18). En dicho análisis, se observó que la viabilidad celular disminuyó conforme se incrementó la concentración de GOQDs, hasta alcanzar un valor mínimo de 25% a la concentración más alta de GOQDs (3,7 mg/l). Estos resultados sirvieron para reflejar que los GOQDs generan inmunotoxicidad y que esta inmunotoxicidad depende de la concentración de GOQDs. Desde el punto de vista del sistema inmune, diversas investigaciones comprobaron que la capacidad defensiva de los macrófagos se ve reducida después de su exposición con GQDs, ya que se detectó que su presencia daba lugar a una disminución significativa en la cantidad de citocinas inflamatorias, por lo que el tratamiento con este tipo de nanomateriales incrementaría la susceptibilidad de los macrófagos ante estímulos posteriores [42]. De manera más específica, se relacionó su presencia con la activación del receptor del sistema inmunitario innato TLR y la posterior estimulación de la ruta MAPK o NF- κ B, vinculadas a la modulación de la expresión de distintos genes, lo que generaría genes proinflamatorios y simultáneamente, desencadenando una respuesta inmune [43].

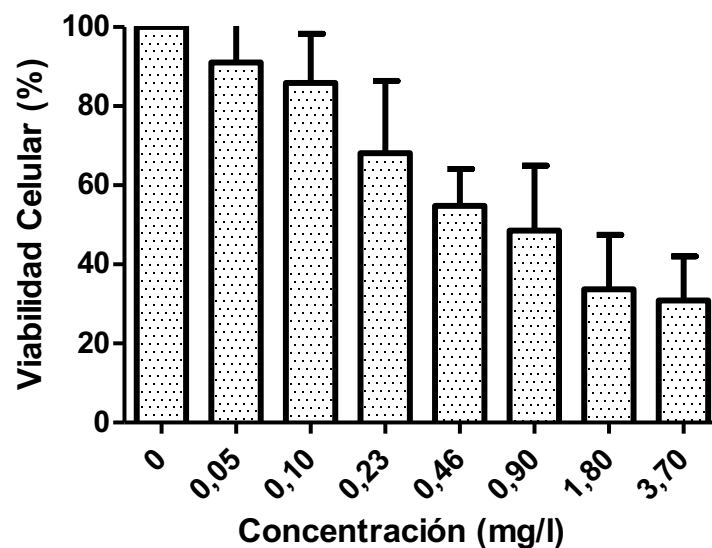


Figura 18: Estudio de la viabilidad celular de los macrófagos ante la presencia de distintas concentraciones de GOQDs a 5 días

4 Conclusiones

El trabajo de investigación desarrollado a lo largo del presente Trabajo de Fin de Master se centró en el estudio de la toxicidad ambiental *in vivo* e *in vitro* producida por los materiales grafénicos, GOQDs. Los estudios de toxicidad realizados permitieron evaluar la viabilidad de estos nanomateriales grafénicos en aplicaciones biomédicas. Todos los GOQDs empleados fueron previamente sintetizados y caracterizados en el laboratorio. Las principales conclusiones de este trabajo se destacan a continuación:

- Los GOQDs obtenidos a partir de CNF mediante el proceso de oxidación/exfoliación resultaron estar correctamente sintetizados. La estrategia *top-down* seguida consigue un rendimiento en peso de GOQDs (20-25%) superior al del resto de estrategias *top-down* descritas (10%).
- A nivel de toxicidad ambiental *in vivo*, la exposición aguda (5 días) a una concentración de GOQDs de 37 mg/l en *C.elegans* no influye ni en la letalidad ni en el desarrollo de los gusanos. Sin embargo, la exposición crónica (25 días) a tal concentración de GOQDs si que ocasiona importantes daños, llegando a obtener una tasa de supervivencia del 25% al cabo de los 25 días.
- La toxicidad producida por los GOQDs en las distintas líneas celulares (Hep G2, Caco-2, SH-SY5Y) depende tanto del periodo de exposición como de la concentración de los GOQDs, obteniendo una mayor toxicidad a medida que se aumentan dichos parámetros.
- La línea celular Caco-2 presenta una mayor resistencia a la toxicidad producida por los GOQDs, en comparación con el resto de líneas celulares. Esta mayor resistencia se relaciona con la menor capacidad que tendrían los GOQDs de atravesar la membrana celular de las células Caco-2.
- La comparación de los resultados de toxicidad obtenidos entre las líneas diferenciadas (neuronales) y no diferenciadas (SH-SY5Y) evidencia una mayor sensibilidad a la toxicidad producida por los GOQDs por parte de las células diferenciadas.
- El análisis de la toxicidad inmunológica revela que la presencia de los GOQDs en macrófagos produce inmunotoxicidad y que esta inmunotoxicidad depende de la concentración de GOQDs empleada.

5 Bibliografía

- [1] Andreas Hirsch *"The era of carbon allotropes"*, Nature Materials, 9 (2010).
- [2] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, *"C₆₀: Buckminsterfullerene"*, Nature 318, 162-163 (1985).
- [3] Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., et al. *"Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films"* Science 306, 666 (2004).
- [4] J. Slonczewski, P. Weiss, *"Band structure of graphite"*, Phys. Rev. 109 (2), 272 (1958) .
- [5] L. Landau, *"Theorie der phasenumwandlungen II"*, Phys. Z. Sowjetunion 11 26–35 (1937).
- [6] L.D. Landau, E. Lifshitz, *"Statistical physics, part I"*, Course Theor. Phys. 5 468 (1980).
- [7] K. Novoselov, A.K. Geim, S. Morozov, D. Jiang, M. Katsnelson, I. Grigorieva, S. Dubonos, A. Firsov, *"Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene"*, Nature 438, 197–200 (2005).
- [8] Kim, K., Zhao, Y., Jang, H. et al. *"Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes"*. Nature 457, 706–710 (2009).
- [9] Balandin, A.A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F. and Lau, C.N. *"Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene"*. Nano Letters 8, 902-907 (2008).
- [10] Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. *"Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene"*, Science 321, 385-388 (2008).
- [11] Jariwala, D., Sangwan, V. K., Lauhon, L. J., Marks, T. J., & Hersam, M. C. *"Carbon nanomaterials for electronics, optoelectronics, photovoltaics, and sensing"*. Chemical Society Reviews 42, 2824-2860 (2013).
- [12] Ettetfaghi, E., Ghobadian, B., Rashidi, A., Najafi, G., Khoshtaghaza, M.H., Pourhashem, S., 2017. *"Preparation and investigation of the heat transfer properties of a novel nano-fluid based on graphene quantum dots"*. Energy Convers. Manag. 153, 215–223 (2017).
- [13] Lee, J.S., Youn, Y.H., Kwon, I.K., Ko, N.R., 2018. *"Recent advances in quantum dots for biomedical applications"*. J. Pharm. Investig., 1–6 (2018).
- [14] L. A. Ponomarenko, F. Schedin, M. I. Katsnelson, R. Yang, E. W. Hill, K. S. Novoselov and A. K. Geim, *"Chaotic Dirac Billiard in Graphene Quantum Dots,"* Science 320, 356-358 (2008).
- [15] Li X, Rui M, Song J, Shen Z, Zeng H. *"Understanding and manipulating luminescence in carbon nanodots"* Adv Funct Mater. 25, 4929-47 (2015).

- [16] Jang M-H, Ha HD, Lee E-S, Liu F, Kim Y-H, Seo TS, et al. *"Unique properties of graphene quantum dots and their applications in photonic/electronic devices"* Small. 11, 3773-81 (2015).
- [17] S. Benítez-Martínez, M. Valcárcel/Trends *"Graphene quantum dots in analytical science"* Analytical Chemistry 72, 93–113 (2015).
- [18] T.K. Henna and K. Pramod *"Graphene quantum dots redefine nanobiomedicine"* Materials Science & Engineering 110, 110651 (2020).
- [19] F. Chen et al. *"Graphene quantum dots in biomedical applications: Recent advances and future challenges"* Frontiers in Laboratory Medicine 1, 192–199 (2017).
- [20] Lalwani G, D'Agati M, Khan AM, Sitharaman B. *"Toxicology of graphene-based nanomaterials"*. Adv Drug Deliv Rev.105(Pt B), 109-144 (2016).
- [21] Jing, Y., Zhu, Y., Yang, X., Shen, J., Li, C., *"Ultrasound-triggered smart drug release from multifunctional core-shell capsules one-step fabricated by coaxial electrospray method"*. Langmuir 27 (3), 1175–1180 (2010).
- [22] Chen, M.L., He, Y.J., Chen, X.W., Wang, J.H., 2013. *"Quantum-dot-conjugated graphene as a probe for simultaneous cancer-targeted fluorescent imaging, tracking, and monitoring drug delivery"*. Bioconjugate Chemistry 24 (3), 387–397 (2013).
- [23] Qiu, J., Li, D., Mou, X., Li, J., Guo, W., et al. *"Effects of graphene quantum dots on the self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells"*. Adv. Healthc. Mater 5 (6), 702–710 (2016).
- [24] Chong, Y., Ma, Y., Shen, H., et al., *"The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. Biomaterials"* 35 (19), 5041–5048 (2014).
- [25] Wang, T., Zhu, S., Jiang, X., 2015. *"Toxicity mechanism of graphene oxide and nitrogen-doped graphene quantum dots in RBCs revealed by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy"*. Toxicology Research 2015 (4), 885–894 (2015).
- [26] Shang, W., Zhang, X., Zhang, M., et al. *"The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells"*. Nanoscale 6 (11), 5799–5806 (2014).
- [27] William S., Hummers Jr., Richard E., *"Preparation of Graphitic Oxide"*, Journal of the American Chemical Society 80 (6), 1339 (1958).
- [28] Torres, D., Pinilla, J.L., Gálvez, E.M., Suelves, I. *"Graphene quantum dots from fishbone carbon nanofibers"*. RSC Advances. 2016. 6 (54), 48504-48514 (2016).

- [29] Juan Peng, Wei Gao, Bipin Kumar Gupta, Zheng Liu, Rebeca Romero-Aburto, Liehui Ge, Li Song, *"Graphene Quantum Dots Derived from Carbon Fibers"* Nano Letters 12 (2), 844-849 (2012).
- [30] Yang, P., Zhou, L., Zhang, S., Wan, N., *"Facile synthesis and photoluminescence mechanism of graphene quantum dots"*. J. Appl. Phys. 116, 244306 (2014).
- [31] B. Karimi, B. Ramezanzadeh *"A comparative study on the effects of ultrathin luminescent graphene oxide quantum dot (GOQD) and graphene oxide (GO) nanosheets on the interfacial interactions and mechanical properties of an epoxy composite"* Journal of Colloid and Interface Science 493 62–76 (2017).
- [32] Chunfang Zhang, Kaifang Wei, Wenhai Zhang, Yunxiang Bai, Yuping Sun, and Jin Gu *"Graphene Oxide Quantum Dots Incorporated into a Thin Film Nanocomposite Membrane with High Flux and Antifouling Properties for Low-Pressure Nanofiltration"* ACS Applied Materials & Interfaces 9 (12), 11082-11094 (2017).
- [33] Chong, Yu Ma, Yufei Shen, He Tu, Xiaolong Zhou, Xuan Xu, Jiaying Dai, Jianwu Fan, Saijun Zhang, Zhijun *"The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots"*. Biomaterials. 35 (2014).
- [34] Liu P, Shao H, Kong Y, Wang D. *"Effect of graphene oxide exposure on intestinal Wnt signaling in nematode Caenorhabditis elegans"*. J Environ Sci (China). 2020;88:200-208. (2019).
- [35] Sotirios I. Sinisa, Konstantinos I. Gourgoulialisb, Chrissi Hatzoglou *"Mechanisms of engineered nanoparticle induced neurotoxicity in T Caenorhabditis elegans"* Environmental Toxicology and Pharmacology 67 29–34 (2019).
- [36] Kim M, Eom HJ, Choi I, Hong J, Choi J. *"Graphene oxide-induced neurotoxicity on neurotransmitters, AFD neurons and locomotive behavior in Caenorhabditis elegans"* Neurotoxicology.77:30-39 (2020).
- [37] Zenata, Ondrej Vrzalova, Aneta Bachleda, Petr Janeckova, Jana Panacek, Ales Kvitek, Libor Vrzal, Radim. *"The effect of graphene oxide on signalling of xenobiotic receptors involved in biotransformation"*. Chemosphere 253. 126753 (2020).
- [38] Peuschel, H., Ruckelshausen, T., Kiefer, S. et al. *"Penetration of CdSe/ZnS quantum dots into differentiated vs undifferentiated Caco-2 cells"*. J Nanobiotechnol 14, 70 (2016).
- [39] Ren, Chaoxiu Zhou, Qixing. *"Graphene Oxide Quantum Dots Reduce Oxidative Stress and Inhibit Neurotoxicity In Vitro and In Vivo through Catalase-Like Activity and Metabolic Regulation"*. Advanced Science. 5. 1700595 (2018).

- [40] Walters, R., Medintz IL., Delehanty J.B., *"The Role of Negative Charge in the Delivery of Quantum Dots to Neurons."* ASN Neuro.7(4): 1759091415592389 (2015).
- [41] Li, Xiaoming Chen, Nan Su, Yuanyuan He, Yao Yin, Min Wei, Min Wang, Lianhui Huang, (2014). *"Autophagy-Sensitized Cytotoxicity of Quantum Dots in PC12 Cells"*. Advanced healthcare materials 3 (2014).
- [42] Nguyen KC, Seligy VL, Tayabali AF. *"Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to Pseudomonas aeruginosa."* Nanotoxicology. 7(2), 202-211 (2013).
- [43] Ho, Chia-Chi Luo, Yueh-Hsia Chuang, Tsung-hsien &Yang, Chung-Shi Ling, Yong-Chie Lin, Pinpin. *"Quantum dots induced monocyte chemotactic protein-1 expression via MyD88-dependent Toll-like receptor signaling pathways in macrophages."* Toxicology. 308. (2013)

ANEXOS

ÍNDICE GENERAL

1	Anexo I: Tabla de reactivos	1
2	Anexo II: Fundamento teórico de las técnicas de caracterización empleadas.....	2
2.1	Microscopía electrónica de transmisión.....	2
2.2	Difracción de rayos X	3
2.3	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X	4
2.4	Análisis Elemental.	5
3	Anexo III: Materiales y métodos.....	6
3.1	Cultivo y sincronización <i>C.elegans</i>	6
3.2	Cultivos celulares.....	7
3.2.1	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	7
3.2.2	Congelación y descongelación de las líneas celulares	7
3.2.3	Determinación de la densidad celular	7
3.3	Obtención de macrófagos.....	8
3.4	Espectrofotometría	10
3.4.1	Ley de Lambert-Beer	11
3.5	Determinación de la longitud de onda para el ensayo de toxicidad <i>in vitro</i>	12
3.6	Imágenes obtenidas del análisis de toxicidad <i>in vitro</i> de los GOQDs.....	13
3.7	Determinación de la presencia de endotoxinas.....	14
4	Bibliografía.....	15

ÍNDICE FIGURAS

Figura A1: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) [1]	2
Figura A2: Proceso de difracción de rayos X (XRD) [2]	3
Figura A3: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X [3]	4
Figura A4: Detector empleado para el análisis elemental	5
Figura A5: Imagen ilustrativa del resultado final que se obtiene a partir de la técnica Ficoll-HyPaque, donde puede observarse la formación de las diferentes capas celulares en función de su densidad.	9
Figura A6: Imágenes del cultivo celular de macrófagos obtenidos en el laboratorio	10
Figura A7: Esquema de un espectrofotómetro [4]	11
Figura A8: Estudio de la absorbancia de los GOQDs para distintas concentraciones	13
Figura A9: Estudio de la toxicidad in vitro en las células Hep G2 (1) y SH-SY5Y (2) ante la presencia de los GOQDs	13

ÍNDICE TABLAS

Tabla A1: Reactivos utilizados durante el proceso de síntesis	1
---	---

ANEXOS

1 Anexo I: Tabla de reactivos

Tabla A 1: Reactivos utilizados durante el proceso de síntesis

Nombre Compuesto	Fórmula	Proveedor	Estado	Pureza
Nitrato de sodio	NaNO ₃	SIGMA-ALDRICH	Sólido	99.99%
Permanganato de potasio	KMnO ₄	SIGMA-ALDRICH	Sólido	99,9%
Agua Oxigenada	H ₂ O ₂	SIGMA-ALDRICH	Líquido	99.8%
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	SIGMA-ALDRICH	Líquido	99%
Ácido Clorhídrico	HCl	SCHARLAU	Líquido	37%
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio	MTT	SIGMA-ALDRICH	Sólido	98%
Bifosfato de sodio	Na ₂ HOP ₄	SIGMA-ALDRICH	Sólido	99,5%
Cloruro de sodio	NaCl	SCHARLAU	Sólido	99%
Fosfato de monopotasio	KH ₂ PO ₄	SIGMA-ALDRICH	Sólido	99%
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	SIGMA-ALDRICH	Líquido	99,5%
Ácido retinoico	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	SIGMA-ALDRICH	Sólido	99,8%

2 Anexo II: Fundamento teórico de las técnicas de caracterización empleadas

2.1 Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada (Figura A1). Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre un dispositivo de carga acoplada (CCD) que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes [1].

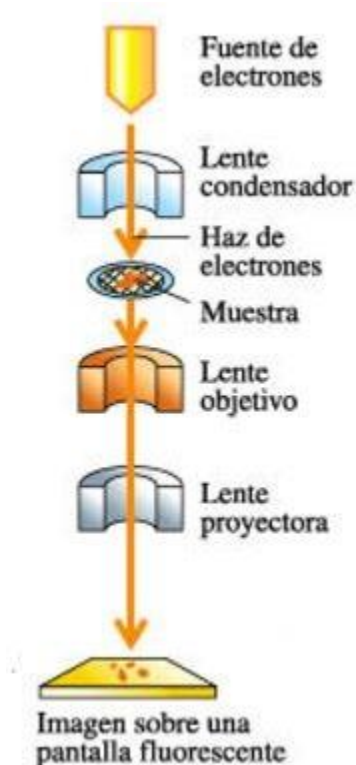


Figura A1: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) [1]

2.2 Difracción de rayos X

La técnica de la difracción de rayos X (XRD) consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido sujeto a estudio. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión (Figura A2). Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación [2]. El resultado de todo esto es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2 d \sin \theta \text{ [Ec. A1]}$$

Dónde:

λ : longitud de onda de los rayos X.

n: orden de la difracción

θ : ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión

d: distancia interplanar del cristal

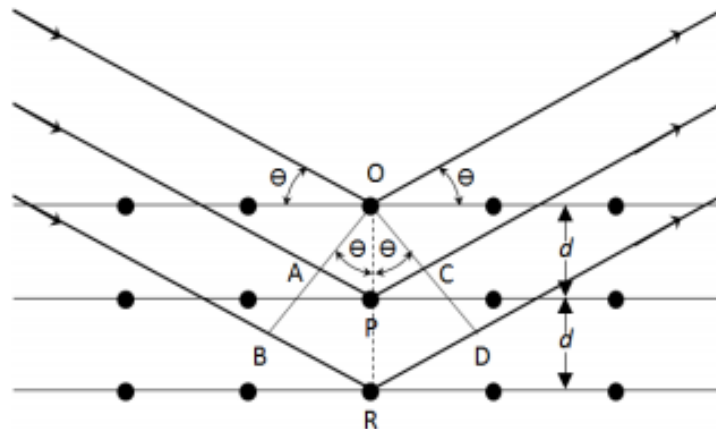


Figura A2: Proceso de difracción de rayos X (XRD) [2]

2.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X

La técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS) consiste básicamente en la excitación mediante un haz de rayos-X de los niveles más internos de los átomos, provocando la emisión de fotoelectrones que nos proporcionan información sobre la energía de cada nivel y, por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor (Figura A3). Puesto que la energía del haz es $h\nu$, si el fotoelectrón sale con una energía cinética E_K , la diferencia entre ambas nos da la energía de ligadura (EL) del átomo en particular, característica de cada elemento. Todo se resume a medir la velocidad de los electrones emitidos mediante el espectrómetro. Para ello es necesario trabajar en condiciones de Ultra Alto Vacío UHV (ultra high vacuum). Esto se consigue mediante el uso de bombas turbo-moleculares y bombas iónicas apoyadas con vacíos previos obtenidos por bombas rotatorias de aceite [3].

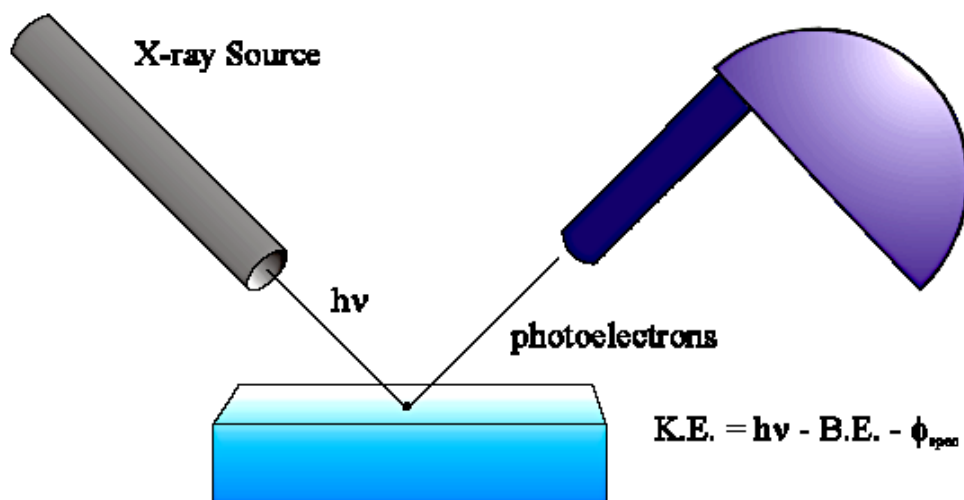


Figura A3: Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X [3]

2.4 Análisis Elemental.

La técnica del análisis químico elemental permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre (C, H, N y S) presente en muestras orgánicas e inorgánicas, tanto sólidas como líquidas, que no posean calcio ni fósforo. Estos análisis permiten la determinación del contenido de estos elementos en las muestras estudiadas, lo que es esencial para la determinación de la composición química de los materiales. El análisis elemental de C, H, N y S se basa en la volatilización de una muestra por combustión total en atmósfera de oxígeno puro, liberándose los elementos a medir en forma de CO₂, H₂O, NO_x y SO_x, respectivamente. Un proceso posterior de reducción transforma los NO_x y SO_x en N₂ y SO₂, respectivamente. Todos los gases así formados (CO₂, H₂O, N₂ y SO₂) son analizados cuantitativamente en un detector (Figura A4). Equipamiento Los análisis se llevan a cabo en un analizador elemental. La muestra se oxida por completo y de manera instantánea transformando todos los compuestos presentes en productos de combustión. Los gases de combustión resultantes son enviados a un tubo de reducción mediante un caudal de 250 cm³/min de gas portador (He) y posteriormente son separados selectivamente en columnas específicas. Finalmente, los gases son desorbidos térmicamente e introducidos de forma separada a un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la muestra.



Figura A4: Detector empleado para el análisis elemental

3 Anexo III: Materiales y métodos

3.1 Cultivo y sincronización *C.elegans*

Los gusanos *C. elegans* se cultivaron en placas de agar NGM con kanamicina 50 µg/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Se utilizó *E. Coli OP50* como fuente de alimento y se guardaron en una estufa a 20 °C. La sincronización comenzó con el lavado de tres placas de agar NGM de 100 mm con 6 ml del tampón M9 (Na₂HPO₄, 6g; NaCl, 5g; KH₂PO₄, 3g; H₂O destilada, 1l y 1 ml de MgSO₄ 1M), cada una. La suspensión de gusanos en tampón M9 obtenida se transfirió a tubos Falcon de 15 ml. Se pueden usar 4 ml más de M9 con el objetivo de despegar los huevos de las placas de agar NGM. La suspensión se centrifugó a 650 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se desechó hasta que quedan 2 ml en el tubo Falcon de 15 ml. A continuación, se añadió la solución de lejía que contiene NaOH y NaClO a los gusanos para alcanzar un volumen final de 4 ml y las concentraciones finales de NaOH y NaClO de 0,25% y 1%, respectivamente. La solución de NaClO debe prepararse diariamente debido a la pérdida de efectividad. Los gusanos con la disolución de lejía se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se tomó una alícuota para verificar si se había conseguido eliminar los gusanos vivos empleando un microscopio de disección. Si se mantienen los gusanos vivos o la cutícula de la mayoría de los gusanos no se ha roto se podría volver a utilizar el vórtex, realizando vorteos de 10 segundos hasta un tiempo máximo de contacto de 6 minutos. También es posible que se necesite una mayor concentración de NaOH para poder romper la cutícula si la suspensión contiene demasiados gusanos. Observar los gusanos de manera regular en un microscopio de disección proporciona la mejor información para saber cuándo se debe detener el proceso. Una vez obtenidas las condiciones necesarias, el tubo Falcon de 15 ml se llenó con tampón M9 y se centrifuga 2 minutos a 650 rpm y se repitió este proceso de lavado dos veces con el objetivo de eliminar el máximo contenido de la solución de lejía. El sobrenadante del lavado con M9 se desechó hasta que solo quedan 0,5 ml en el tubo. El sedimento de huevos se resuspendió y se colocó en una placa de agar NGM sin *E. Coli OP50* para permitir que los huevos eclosionen y reducir así las diferencias de desarrollo en las nuevas larvas debido a la diferente edad de los huevos. Transcurridas 24h se añadió *E. Coli OP50* a la placa de agar NGM y se guardó en una estufa a 25 °C.

3.2 Cultivos celulares

3.2.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

El cultivo rutinario de las distintas líneas celulares se realizó utilizando frascos de cultivo de 25 cm² (TPP) con tapón con filtro, en un volumen aproximado de 5ml, las células se sembraron con una densidad inicial de $4 \cdot 10^4$ células/ml. Una vez alcanzadas las densidades de saturación a estas condiciones, se establecieron sub-cultivos derivados de los iniciales. Para ello, las células se despegaron mediante incubación con tripsina/EDTA a 37 °C durante 5 minutos. Una vez transcurrido este periodo, con el fin de inactivar la tripsina se añadieron 5 ml de medio fresco con suero, y las células se transfirieron a tubos de fondo cónico para determinar así el número de células y su viabilidad. El volumen obtenido se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm en una centrifuga Beckman and Coulter (Rotor SX4750A), se eliminó el sobrenadante y las células se resembraron en medio fresco o bien, se utilizaron para llevar a cabo los diferentes experimentos.

3.2.2 Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para el proceso de congelación se tomaron 10^7 células que tras ser centrifugadas (1200 rpm x 5 min) y eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM completo con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se transvasaron a un criotubo de congelación estéril. Estos viales se congelaron a menos 80°C hasta su utilización.

Por otro lado, para el proceso de descongelación el criotubo donde se encuentran las células se dejó atemperar durante 1 minuto en la campana de flujo laminar. Una vez transcurrido este periodo, la suspensión celular se trasvasa a un tubo falcon™ preparado previamente con 5 ml de medio DMEM completo. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de medio fresco DMEM.

3.2.3 Determinación de la densidad celular

La determinación de la densidad celular se realizó mediante la tinción con Azul de Tripán (Sigma), colorante que es capaz de penetrar en las células muertas que tienen membrana plasmática dañada tiñéndolas de color azul. Las células vivas, que no pierden la integridad de la membrana plasmática, no se tiñen.

El recuento se realizó mezclando 50 µl de una determinada suspensión celular y 50 µl de Azul de Tripán, la mezcla se colocó sobre una cámara de Neubauer y se realizó el recuento celular en un microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

- La densidad celular se determinó mediante la siguiente formula:

$$DC \left(\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ de células vivas} * \text{Factor de dilución} * 10^4}{N^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

DC: Densidad celular

10⁴: Ajuste al tamaño de la cámara

Factor de dilución: 2 (mezcla 50µl + 50µl)

3.3 Obtención de macrófagos

Los medios utilizados para la obtención de los macrófagos fueron los siguientes:

- Medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco) suplementado con 1% de suero humano AB inactivado y filtrado, L-glutamina 2mM y antibiótico (penicilina 1000 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml).
- Medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de SFB descomplementado, 1% de L-glutamina 2 mM y 1% de antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml): RPMI completo.

El factor de crecimiento utilizado en el protocolo:

- GM-CSF: Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. Actividad biológica: 0,02-0,1 ng/ml.

El suero utilizado en los experimentos realizados con células humanas se descomplementó para evitar la lisis de las células por el sistema del complemento. Para ello, se trató durante 30 minutos a 56 °C y transcurrido este tiempo se centrifugo a 1000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue recogido en un tubo de fondo cónico y se congeló hasta su uso.

El protocolo de obtención de macrófagos se inició realizando una centrifugación en gradiente de Ficoll partiendo de una capa leucocitaria o “*buffy coat*” procedente del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Se trata de una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar células mononucleares del resto de células sanguíneas (Figura A5).

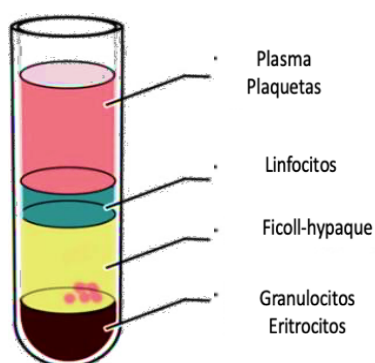


Figura A5: Imagen ilustrativa del resultado final que se obtiene a partir de la técnica Ficoll-HyPaque, donde puede observarse la formación de las diferentes capas celulares en función de su densidad.

La sangre total se diluyó en proporción 1:1 en tampón fosfato salino PBS (NaCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4) se tomó un volumen adecuado para una proporción 2:1 con el reactivo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) y la sangre diluida se depositó suavemente sobre el Ficoll para mantener la interfase. Se centrifugó sin freno durante 20 min a 1000 rpm y luego se recolectó la interfase, es decir, la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Se hicieron 3 lavados con tampón PBS y se añadió medio RPMI completo. Se tomó una alícuota de la suspensión celular para determinar la densidad y viabilidad celular mediante tinción con Azul de Tripán, el pellet celular se resuspendió a una concentración final de $2,5 \times 10^6$ células/ml con medio RPMI+ suero humano AB y se cultivaron las células en una placa de Petri durante 2 horas a 37°C . Finalmente, después de realizar otra serie de lavados con tampón PBS atemperado, se añadió medio RPMI completo junto con el factor de crecimiento GM-CSF (Invitrogen) a una concentración de $0,1 \text{ ng/ml}$. El cultivo celular se mantuvo durante 6 días para completar la diferenciación de los monocitos a macrófagos (Figura A6) en un incubador termostatzado (Heraeus Cell) a 37°C , en aire saturado de humedad y con un 5% de CO_2 .

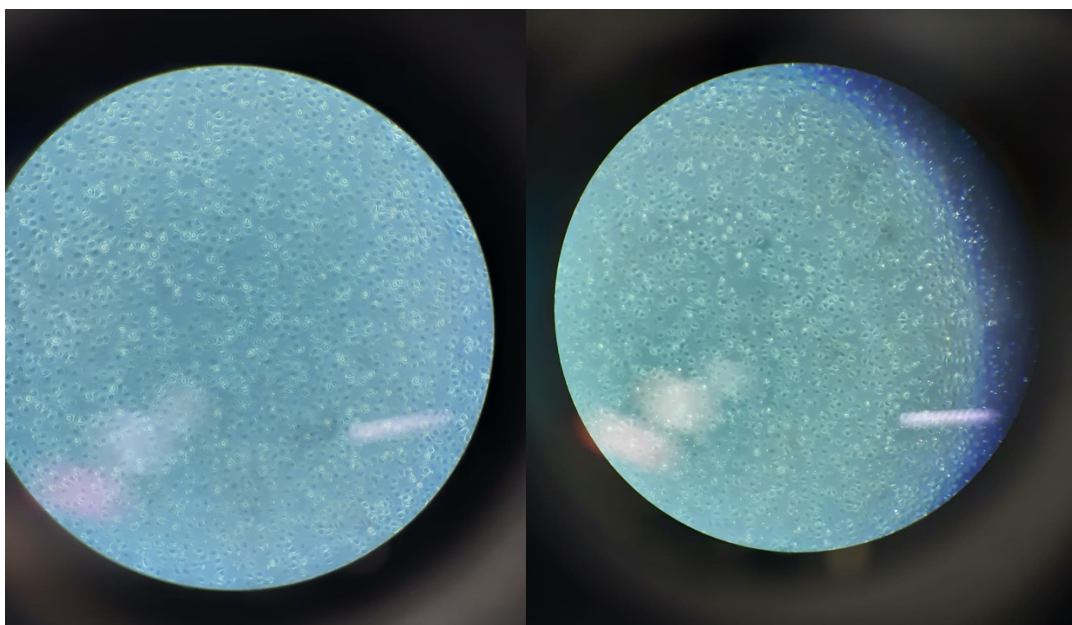


Figura A6: Imágenes del cultivo celular de macrófagos obtenidos en el laboratorio

3.4 Espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución (Figura A7). Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Ley de Lambert-Beer). El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV- visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro [4]. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en

UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.

4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.

5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

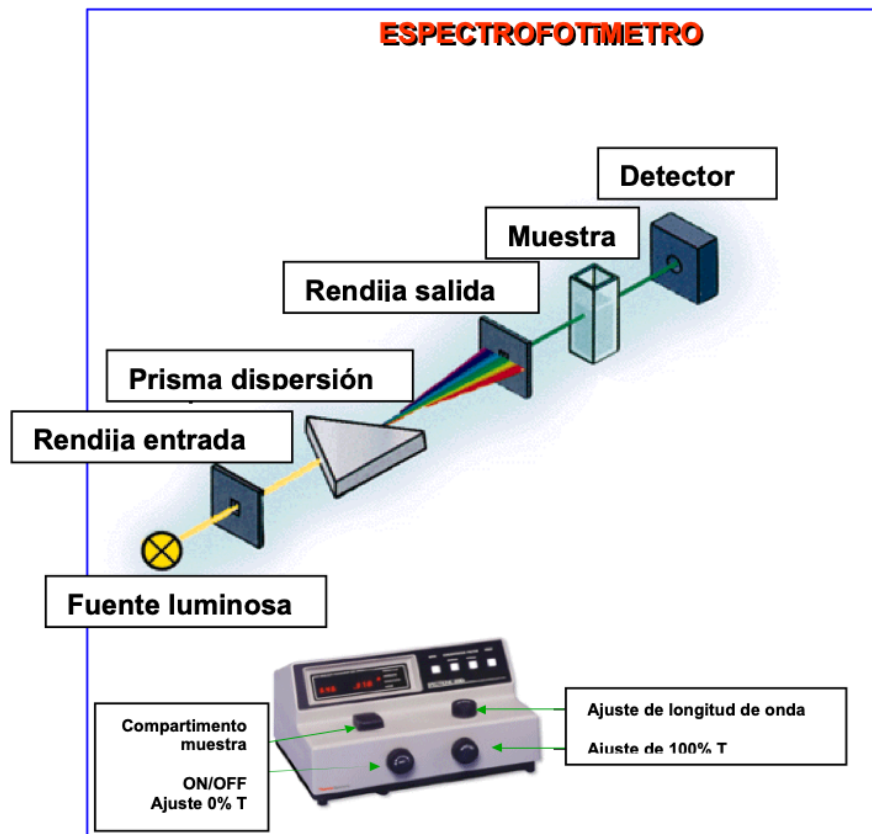


Figura A7: Esquema de un espectrofotómetro [4]

3.4.1 Ley de Lambert-Beer

La Ley de Lambert-Beer expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y la concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon * c * l$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración – a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución – a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará-; y por último, depende de ε , una constante proporcionalidad -denominada coeficiente de extinción- que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ε dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de ε resultan ser $M^{-1}.cm^{-1}$. Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar (εM).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ε varía debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

3.5 Determinación de la longitud de onda para el ensayo de toxicidad *in vitro*

En la Figura A8 se muestra el análisis de la absorbancia de distintas concentraciones de GOQDs a distintas longitudes de onda. Para que no interaccione con los resultados del ensayo de toxicidad se necesita emplear una longitud de onda a la cual la absorbancia producida por los propios GOQDs sea mínima. En este caso, la concentración máxima empleada en los ensayos de toxicidad es de 3,7 mg/l, por lo que a partir de los 500 λ ya se estaría en un valor de absorbancia próximo al 0. Como se tiene que elegir un valor concreto, en este caso, se ha decidido trabajar a una longitud de onda de 570 λ , debido a que el espectrofotómetro ya se encuentra configurado para realizar la medición a esa longitud de onda.

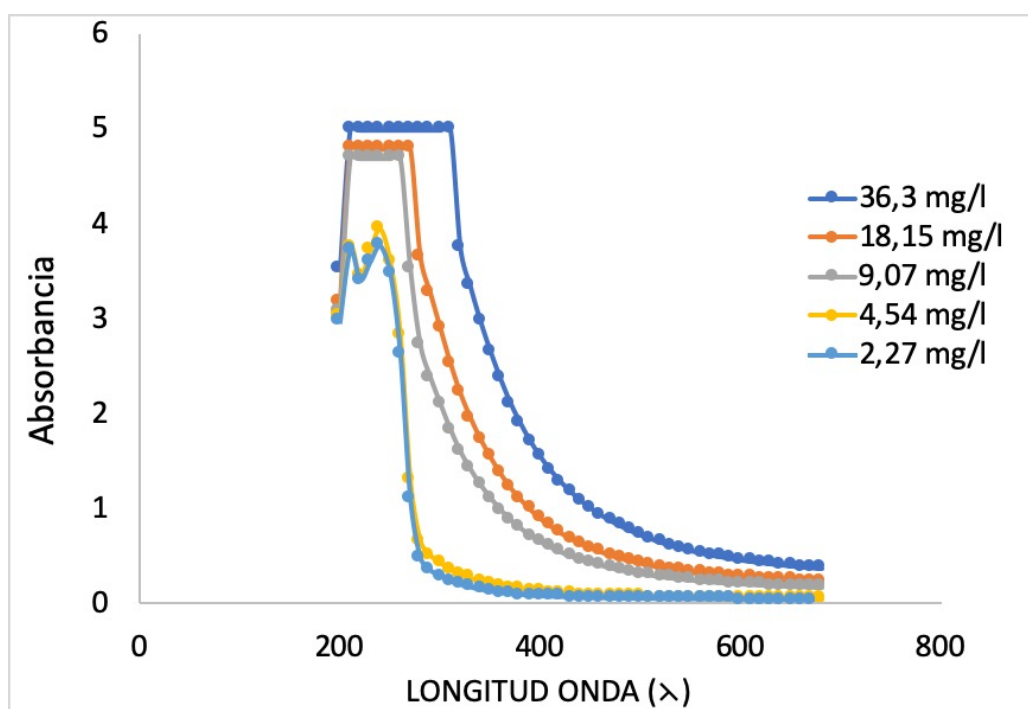


Figura A8: Estudio de la absorbancia de los GOQDs para distintas concentraciones

3.6 Imágenes obtenidas del análisis de toxicidad *in vitro* de los GOQDs

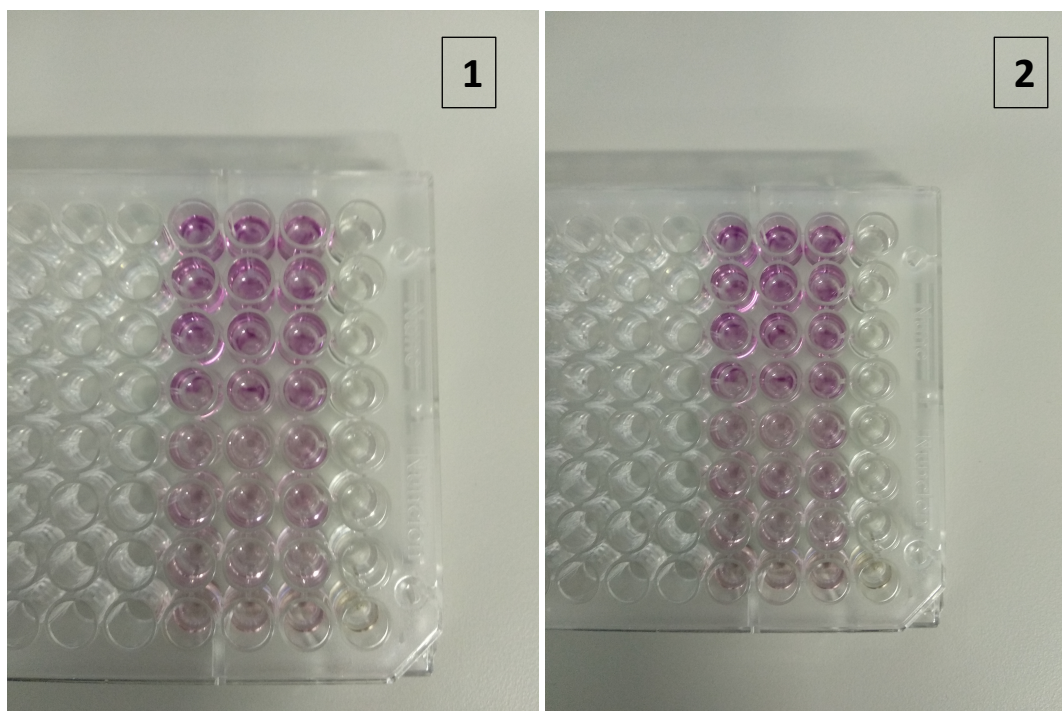


Figura A9: Estudio de la toxicidad *in vitro* en las células Hep G2 (1) y SH-SY5Y (2) ante la presencia de los GOQDs

3.7 Determinación de la presencia de endotoxinas

Para la determinación de la presencia de endotoxinas se utilizó el kit *ToxinSensor Endotoxin Detection System* de la casa comercial GenScript. Este método utiliza un lisado de amebocitos de *Limulus* modificado y un sustrato que produce un color sintético para detectar la presencia de endotoxinas criogénicamente. La elección de este kit se debe a que realiza la lectura de absorbancia a 545 nm, siendo una longitud de onda superior a la absorbida por las nanopartículas de grafeno, por lo que se impide posibles interferencias en la medición.

En primer lugar es necesario reconstituir los reactivos del kit (el lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), el sustrato cromogénico, la solución de parada y la solución de endotoxina). El LAL y el sustrato cromogénico se reconstituyen agregando 1,7 ml de agua libre de endotoxinas a cada uno. Una vez añadido se agitan durante 30 segundos, evitando la formación de espuma. Por otro lado, la reconstitución de la solución de parada se produce añadiendo 10 ml de tampón S mientras que la solución estándar de endotoxinas se reconstituye añadiendo 2 ml de agua libre de endotoxinas. En este último caso, se vortea 15 minutos para obtener así la solución madre de endotoxinas a una concentración de 1 EU/ml. Una vez obtenida la solución madre se prepararan cuatro soluciones estándar de endotoxinas de diferente concentración (1, 0,5, 0,25 y 0,1 EU/ml), con el objetivo de cubrir todo el rango de concentración deseado para así generar la curva de calibrado. Para la determinación de la presencia de endotoxinas de la muestra se incorporan 100 µl de la muestra a un vial y se deja vortear durante 30 segundos. Agotado el tiempo de vorteo se añade 100 µl de LAL reconstituido a los cinco viales. Cada prueba debe incluir un blanco así que también se añade LAL reconstituido a un vial vacío. Los seis viales se introducen en un incubador termostatzado (Heraeus Cell) a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂ durante 35 minutos. Después de la incubación, se agregan 100 µl de solución de sustrato cromogénico reconstituido a cada vial, en este caso, se agita cada vial de manera manual sin vórtex. A cada vial se agregan 500 µl de la solución de parada, después, 500 µl de estabilizador color 2 y 500 µl del estabilizador color 3. Tras la adicción de cada uno de ellos se agita suavemente cada vial con el objetivo de que se homogeneice toda la solución. Por último, se procede a la lectura de la absorbancia de cada vial a 545 nm utilizando agua destilada como blanco.

4 Bibliografía

- [1] <https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-microscopia/microscopia-electronica-de-transmision.html> (Acceso Julio de 2020)
- [2] http://www.linan-ipicyt.mx/Difraccion_de_rayos_X.html (Acceso Julio de 2020)
- [3] <http://nano-sostenible.com/2018/03/01/espectroscopia-fotoelectronica-de-rayos-x/> (Acceso Agosto de 2020)
- [4] <https://www.metrixlab.mx/espectrofotometria/> (Acceso Agosto de 2020)